

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Martin Bezdíčka**

**Role nízkomolekulárních metabolitů při vývoji kvasinkových kolonií**  
Role of the low – molecular metabolites in the development of yeast colonies

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.8.2016

Podpis

Rád bych zde poděkoval vedoucí své diplomové práce paní prof. RNDr. Zdeně Palkové, CSc. a RNDr. Libuši Váchové, CSc. za uvedení do výzkumné práce a inspiraci ve vědeckém bádání. Dále bych rád poděkoval Ing. Evě Ježkové za každodenní podporu v laboratorní práci a za cenné připomínky a konzultace. Velké poděkování patří také celé mé rodině za jejich značnou podporu během doby mého studia.

# Abstrakt

Výzkum kolonií kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* na pevném glycerolovém médiu prokázal diferenciaci kolonie na dva zcela odlišné specializované buněčné typy U a L. K této diferenciaci dochází pravděpodobně díky komunikaci mezi jednotlivými buňkami a koloniemi kvasinek a v reakci na změny množství živin v médiu. Regulovaný diferencovaný vývoj vede k dlouhodobému přežívání kolonie. Výzkum těchto dvou buněčných typů prokázal vyšší odolnost vůči stresům u U typu buněk a zjistil jistou podobnost vztahu mezi U a L buňkami a vztahu rakovinotvorných buněk vůči zdravým buňkám v savčím organismu. Cílem diplomové práce bylo izolovat tyto dva buněčné typy a testovat jejich odolnost vůči vybraným nízkomolekulárním látkám Ehrlichovy dráhy.

Ehrlichova dráha byla objevena v roce 1907 a klasifikována jako katabolická dráha některých aminokyselin u kvasinek *S. cerevisiae*. V dráze vznikají nízkomolekulární meziprodukty popsané jako odpadní alkoholy a kyseliny. Tyto látky jsou hojně využívány pro své aroma v potravinářství a kosmetice. Několik studií ukázalo, že tyto látky mohou působit jako stresory a mohou ovlivňovat některé důležité funkce buňky jako je například přepínání na pseudohyfální růst u buněk *S. cerevisiae*. V rámci diplomové práce byly vybrány některé látky Ehrlichovy dráhy a ve zjištěných koncentracích byl testován jejich vliv na diferencované U a L buňky *S. cerevisiae*.

**Klíčová slova:** *Saccharomyces cerevisiae*, kvasinková kolonie, Ehrlichova dráha, U buňky, L buňky, tyrosol, kyselina octová, phenylethylacetát, phenylethanol

# Abstract

Previous research of colonies formed by yeast *Saccharomyces cerevisiae* growing on glycerol agar medium revealed two major cell types of U and L cells that are formed within these colonies. This colonial cell differentiation seem to be caused by communication among yeast cells as well as whole colonies and affected by changes in the environment (for example changes in nutrients). Studies of U and L cells showed that U cells are more resistant against biological, chemical and physical stresses than L cells. The aim of this thesis was to isolate U and L cell types and investigate their resistance against selected low molecular weight chemical substances produced in Ehrlich pathway.

Ehrlich pathway was discovered in 1907 and was classified as amino acid catabolic pathway in yeast *S. cerevisiae*. The low molecular intermediates are formed in Ehrlich pathway which are called fusel (original name from German) alcohols and acids. These chemical substances are widely used in food industry and cosmetics especially because of their aroma. Several studies provided indications that these chemical substances may affect development of colonies and important yeast functions such as switching to the pseudohyphal growth of *S. cerevisiae* cells. Some chemical substances of the Ehrlich pathway were selected and their effects on *S. cerevisiae* U and L cells were analyzed by different techniques.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, yeast colony, Ehrlich pathway, U cells, L cells, tyrosol, acetic acid, phenylethylacetate, phenylethanol

# Obsah

1.	Úvod.....	8
2.	Přehled literatury.....	9
2.1.	Kvasinky jako mnohobuněčný mikroorganismus.....	9
2.2.	Vývojové fáze u kolonií <i>S. cerevisiae</i> .....	10
2.3.	Quorum sensing: Signální molekula amoniak.....	11
2.4.	Změna genové exprese během alkalizace.....	13
2.5.	Diferenciace kvasinkových kolonií.....	13
2.5.1.	L buňky vyživující U buňky.....	15
2.5.2.	Další typy diferencovaných buněk u <i>S. cerevisiae</i> .....	16
2.6.	Jiné typy komunikace a signalizace u <i>S. cerevisiae</i> .....	17
2.6.1.	Komunikace pomocí feromonů.....	17
2.6.2.	Signální dráhy regulované živinami.....	18
2.6.3.	Komunikace mezi kvasinkami a hmyzem.....	20
2.6.4.	Ehrlichova dráha.....	21
2.6.4.1.	Nalezení mechanismu dráhy.....	22
2.6.4.2.	Procesy Ehrlichovy dráhy.....	24
2.6.4.3.	Významné látky Ehrlichovy dráhy.....	26
3.	Materiál a metody.....	31
3.1.	Materiál.....	31
3.1.1.	Použité mikroorganismy.....	31
3.1.1.1.	Připravené kvasinkové kmeny odvozené od BY4742.....	31
3.1.2.	Plazmidy.....	32
3.1.3.	Primery.....	33
3.1.4.	Seznam použitých chemikálií a dalších látek.....	35
3.1.5.	Seznam použitých laboratorních přístrojů.....	36
3.1.6.	Média ke kultivaci kvasinek.....	37
3.1.7.	Počítačové programy a internetové databáze.....	38
3.2.	Metody.....	39
3.2.1.	Sterilizace.....	39
3.2.2.	Skladování kvasinkových kmenů.....	39
3.2.3.	Kultivace kvasinkových kmenů.....	39
3.2.4.	Příprava kvasinkových kmenů.....	40
3.2.4.1.	Příprava PCR kazety s fluorescenčním značením GFP.....	40
3.2.4.2.	Elektroforetická analýza.....	41
3.2.4.3.	Transformace kvasinek.....	41
3.2.4.4.	Ověření transformovaných kmenů pomocí metody PCR.....	42
3.2.5.	Další použité metody.....	43
3.2.5.1.	Mikroskopické metody.....	43
3.2.5.2.	Výroba mikroskopických řezů kolonií.....	44
3.2.5.3.	Koncentrační testy látek.....	44
3.2.5.4.	Sekvence DNA.....	45
4.	Cíle práce.....	46
5.	Výsledky.....	47
5.1.	Stanovení koncentračních limitů vybraných látek.....	47
5.1.1.	Phenylethanol v BY4742.....	48
5.1.2.	Phenylethylacetát v BY4742.....	50
5.1.3.	Phenylacetaldehyd v BY4742.....	52

5.1.4.	Tyrosol v BY4742 .....	55
5.1.5.	Kyselina 2 - methylbutanová v BY4742 .....	58
5.1.6.	Kyselina octová v BY4742 .....	61
5.1.7.	Kyselina izomáselná v BY4742 .....	64
5.1.8.	Kyselina izovalerová v BY4742 .....	67
5.2.	Konstrukce kmenů produkujících vybrané proteiny značené GFP .....	69
5.3.	Alkalizační test zkonstruovaných kmenů .....	71
5.4.	Lokalizace buněk produkujících fúzní proteiny v rámci diferencovaných kolonií ...	75
5.5.	Test vlivu vybraných látek na zkonstruované kmeny a lokalizaci jednotlivých proteinů.....	92
6.	Diskuze.....	107
6.1.	Diferenciace kolonií <i>S. cerevisiae</i> a vliv látek na změnu morfologie buněk .....	107
6.2.	Lokalizace GFP označených proteinů a působení vybraných látek .....	109
7.	Souhrn .....	113
8.	Seznam použité literatury .....	114

# 1. Úvod

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou eukaryotní jednobuněčné organismy, které taxonomicky patří mezi houby askomycety. Jsou využívány především v potravinářských odvětvích, jako je vinařství, pivovarnictví nebo pekařství. Vzhledem ke své jednoduchosti, rychlosti množení a genové manipulovatelnosti, jsou také hojně využívány v oblasti genetiky a molekulární biologie jako modelový organismus pro odhalování obecných principů platných u eukaryot (Botstein and Fink 1988). Vedle své jednobuněčné povahy jsou kvasinky schopny vytvářet i mnohobuněčné struktury. V podobě strukturovaných biofilmů a různých povlaků se vyskytují v přírodě například jako kontaminanty ovoce. Mnohobuněčný charakter však mohou mít i hladké kolonie, které vytvářejí laboratorní kmeny této kvasinky.

*S. cerevisiae* zprvu vytváří v hladkých koloniích pouze jeden typ buněk. Po několika dnech, kdy ubývají živiny v médiu, se buňky v kolonii začínají diferencovat na tři typy subpopulací – U (upper), L (lower), O (outer) a vykazují chování mnohobuněčného charakteru. Diferenciace je pro životaschopnost subpopulací velice důležitá, protože mezi jednotlivými buňkami dochází k významnému toku živin a odpadních látek (Cap, Stepanek et al. 2012). Jednou z možností, jak může docházet k diferenciaci je „komunikace“ mezi subpopulacemi pomocí nízkomolekulárních signálních látek a metabolitů, které jsou produkovány při vývoji kvasinkové kolonie (Hazelwood, Daran et al. 2008).

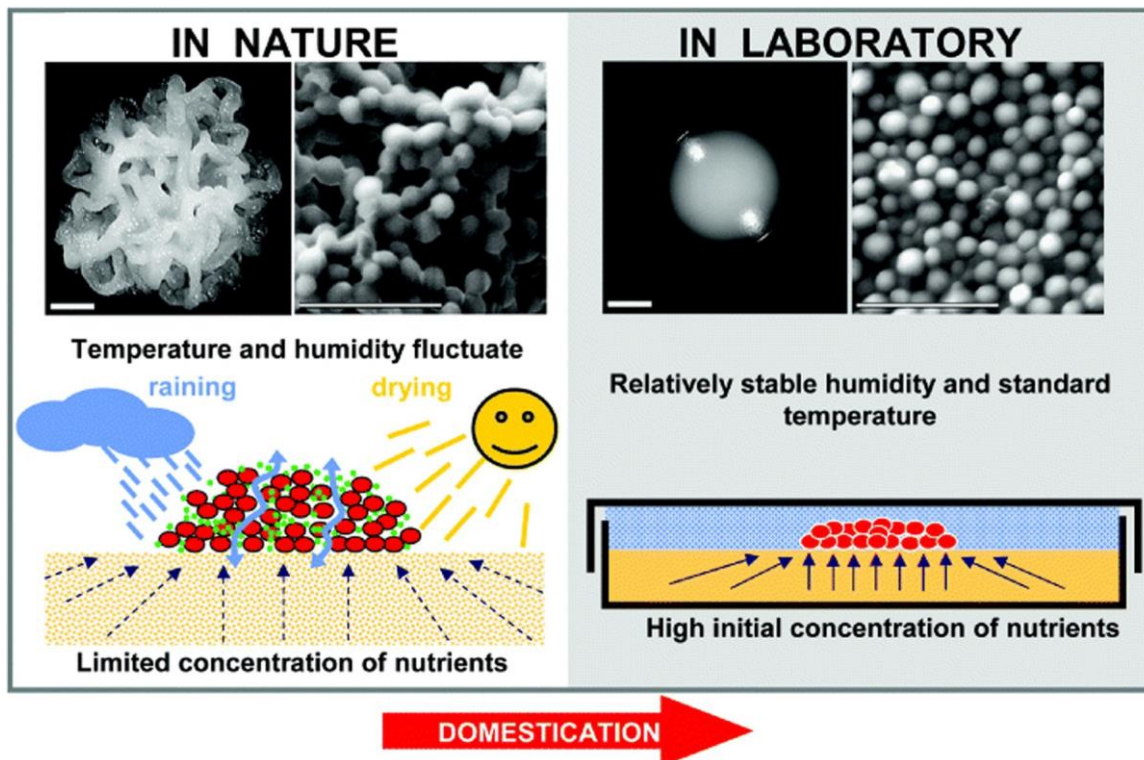


## 2. Přehled literatury

### 2.1. Kvasinky jako mnohobuněčný mikroorganismus

Kvasinky patří mezi jednobuněčné eukaryotní mikroorganismy. V laboratořích se většinou každý mikroorganismus snažíme pochopit studiem jednotlivých buněk. Samostatné buňky můžeme nejlépe studovat v tekutých kulturách. Z tekutých kultur se můžeme dozvědět, jak se buňka sama chová, dělí apod. V laboratorních podmínkách je taková kultivace jednodušší, protože udržujeme ideální podmínky k pozorování. V přírodě se mikroorganismy s ideálními laboratorními podmínkami většinou nesebkají, a proto kvasinky v přírodě volí spíše mnohobuněčnou podobu ve formě kolonií. Život v kolonii je v přírodních podmínkách výhodnější, neboť se kvasinky tímto způsobem dokáží lépe vyrovnávat s působením nepříznivých podmínek v jejich okolí, jako je nedostatek živin nebo změny teploty apod. Díky komunikaci má populace buněk v kolonii lepší šanci přežít než samostatné buňky (Palkova 2004).

V laboratorních podmínkách lze kvasinkové kolonie kultivovat na pevném agarovém médiu. Při porovnávání laboratorních a přírodních kolonií kvasinek *S. cerevisiae* jsou vidět výrazné rozdíly v jejich morfologii (viz Obr. 1). Přírodní „divoký“ kmen vytváří vysoce strukturované kolonie, naopak laboratorní kmen vytváří hladké kolonie. Strukturované kolonie produkují specifickou extracelulární matrix, která se pravděpodobně uplatňuje v ochraně buněk proti nepříznivým přírodním podmínkám (Kuthan, Devaux et al. 2003). Kvasinky mohou v přírodě vytvářet různě složité struktury kolonií specifické pro daný kmen. U laboratorních kmenů *S. cerevisiae* se složitá struktura kolonií nevytváří, takže jejich kolonie zůstávají hladké (Cavalieri, Townsend et al. 2000, Kuthan, Devaux et al. 2003).



Obr. 1. Model s rozdílnou morfologií kvasinek v závislosti na růstu v přírodě (vlevo) a v laboratoři (vpravo). (Palkova and Vachova 2006)

## 2.2. Vývojové fáze u kolonií *S. cerevisiae*

Kvasinkové kolonie se stejně jako jiné populace mikroorganismů vyvíjí. Ani hladká kolonie rostoucí na pevném médiu tedy nezůstává homogenní, ale prochází vývojem, kdy vznikají specializované buňky, v nichž některé mají fenotyp umožňující dlouhodobé přežívání. V kolonii spolu buňky komunikují a mohou tak lépe reagovat na okolní prostředí (Palkova and Vachova 2006). Vývoj kolonie probíhá skrze tři fáze. Tyto fáze jsou spojeny s nápadnými změnami pH okolního prostředí z kyselého přes alkalické zpět do kyselého pH. Jednotlivé fáze jsou: první acidická fáze (first acidic phase), alkalická fáze (alkali phase) a druhá acidická fáze (second acidic phase).

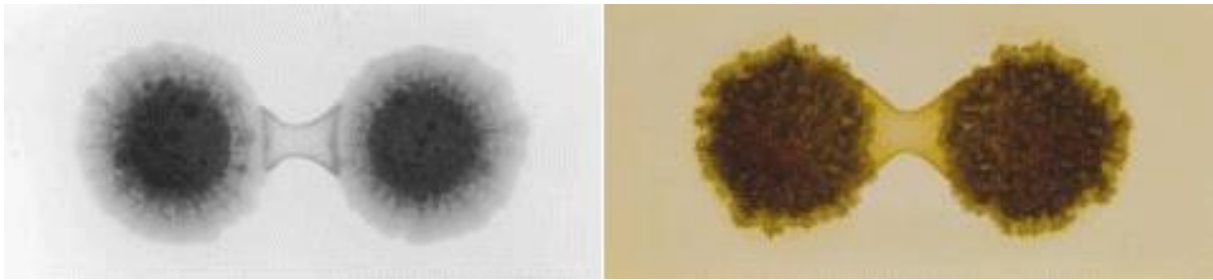
Během první acidické fáze buňky spotřebují velkou část živin a na konci této fáze je jejich růst pozastaven. Přechod do alkalické fáze je pro buňky řešením, jak se vyrovnat s narůstajícím stresem z nedostatku živin. Během přechodu z acidické do alkalické fáze dochází k velké změně genové exprese a s tím spojené produkci plynného amoniaku, který je v tomto případě signální molekulou, díky které probíhá komunikace mezi jednotlivými buňkami kolonie i mezi jednotlivými koloniemi (Palkova, Janderova et al. 1997, Gori,

Mortensen et al. 2007). V buňkách dochází například k aktivaci peroxisomů, k represi oxidativní fosforylace v mitochondriích, k aktivaci metabolických drah některých aminokyselin apod. Díky těmto změnám se kolonie adaptuje na prostředí s menším množstvím dostupných živin (Palkova, Devaux et al. 2002). Buňky kolonie *S. cerevisiae* během vývojových fází postupně diferencují na specializované buňky U, L, O, které jsou dalším předmětem studia této práce (Cap, Stepanek et al. 2012). Při přechodu do druhé acidické fáze, který je už spojen s méně rozsáhlými změnami exprese genů, kolonie opět začnou pomalu přirůstat. Aktivní růst buněk je tedy specifický pro acidické fáze. Naopak v alkalické fázi je růst inhibován a uplatňuje se zde mezibuněčná signalizace pomocí amoniaku (Palkova, Janderova et al. 1997).

### **2.3. Quorum sensing: Signální molekula amoniak**

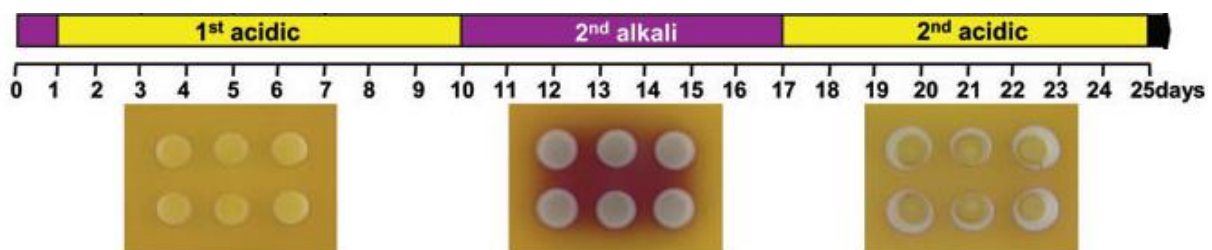
Jak už jsem předeslal, amoniak ( $\text{NH}_3$ ) hraje v koloniích kvasinek včetně *S. cerevisiae* roli signální molekuly.  $\text{NH}_3$  je jedním z důležitých signálních molekul alkalické fáze vývoje kolonie. Jaký je tedy mechanismus jeho působení a jeho důležitost u kvasinkových kolonií?

Během experimentů na obřích koloniích *S. cerevisiae* byla zjištěna tvorba zakalených signálních zón značících přítomnost amoniaku mezi koloniemi („turbid zones“, viz Obr. 2). Aby se tyto zóny vytvořily, musí být kolonie narostlé na komplexním pevném agarovém médiu s vysokou koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a především s dostatečnou koncentrací aminokyselin. Vápenaté kationty i přítomnost aminokyselin jsou nezbytné pro správnou vizualizaci  $\text{NH}_3$  zón, neboť v experimentech s absencí  $\text{Ca}^{2+}$  iontů se zóny nevytvářely (Palkova, Janderova et al. 1997). Během amoniakové signalizace dochází ke dvěma alkalizačním pulzům („alkali pulses“). Druhý pulz je výrazně silnější a zde dochází k tvorbě  $\text{NH}_3$  zóny mezi koloniemi. Po dotvoření zóny přestanou sousední kolonie růst a přechází do alkalické fáze. Signál k inhibici růstu buněk je nezávislý na stáří kolonií. Pokud tedy starší kolonie vydá prvotní pulz, tak okolní mladší kolonie budou reagovat druhým pulzem za vzniku amoniakové zóny a inhibuje se jejich růst. Mechanismus inhibice růstu není bohužel zatím zcela jasný (Palkova and Forstova 2000).



Obr. 2.  $\text{NH}_3$  zóny mezi koloniemi kvasinek na GM agaru. Vlevo *Saccharomyces cerevisiae* (po 20 dnech), vpravo *Candida mogii* (po 7 dnech) (Palkova, Janderova et al. 1997)

Pro potvrzení tvorby amoniaku jako signální molekuly byly nejprve sledovány změny pH agarového média pomocí pH indikátorové barvy „bromcresol purple“ (měnící zbarvení ze žlutého při acidickém pH do fialového při alkalickém pH). Během prvního i druhého signálu se okolí kolonií zbarvilo do fialova, což potvrdilo zvýšení pH v alkalické fázi. V dalších experimentech se zjišťovalo chemické složení zón, které definitivně potvrdilo přítomnost amoniaku. Na chudých médiích bez aminokyselin se zóny netvoří. Produkce amoniaku je pravděpodobně spojena s tvorbou či degradací některých aminokyselin (Palkova, Janderova et al. 1997). Čas nástupu alkalické fáze projevující se změnou pH je u každého kmene kvasinky rozdílný a může se mezi jednotlivými experimenty lišit. Za standardních podmínek se tento jev objevoval obvykle kolem 10. – 14. dne růstu gigantických kolonií (viz Obr. 3).



Obr. 3. Ukázka vývojových fází kolonií *S. cerevisiae*. (Vachova, Kucerova et al. 2009)

## 2.4. Změna genové exprese během alkalizace

Při přechodu z acidické do alkalické fáze dochází k množství změn v genové expresi, které následně ovlivňují vývoj kolonie. Některé příklady již byly jmenovány v předchozích odstavcích. Genů, které jsou aktivované nebo reprimované, je mnoho. Mezi první exprimované geny při diferenciaci jsou ty, které jsou spojeny s biosyntézou či degradací aminokyselin, která může být zdrojem amoniaku. Jsou to například geny *GCVI* (kódující T podjednotku mitochondriální glycinderboxylázy) nebo *SRYI* (kódující 3 – hydroxyaspartátdehydratázu) (Palkova, Devaux et al. 2002).

Velmi zásadní se zdají být geny z rodiny proteinových transportérů YaaH, jejichž exprese nastupuje hned se začátkem alkalické vývojové fáze. Patří sem tři geny – *ATO1*, *ATO2* a *ATO3*. Jejich produkty jsou transmembránové transportéry, které mají nějakou roli v exportu amoniaku. Uskutečnilo se několik experimentů, které verifikovaly spojitost těchto proteinů s transportem amoniaku při začínající alkalizaci. Například u buněk mutantních kmenů *S. cerevisiae* v jednom z genů rodiny *ATO* se snížila produkce amoniaku při alkalizačním pulsu oproti kontrole buněk rodičovského kmene. Dále buňky z kolonií po zvýšení exprese *ATO* genů v alkalické fázi produkovaly mnohem více amoniaku než buňky pocházející z kolonií v první acidické fázi. Nakonec bylo zjištěno, že buňky po zvýšení exprese *ATO* genů jsou odolnější proti toxickým analogům amoniaku, pravděpodobně díky zvýšenému exportu těchto toxických látek ven z buňky. *ATO* geny patří viditelně mezi důležité geny při produkci amoniaku. Nebylo však zatím prokázáno, že Ato proteiny jsou přímo exportéry amoniaku. Existují také geny, jejichž exprese je naopak při přechodu z acidické do alkalické fáze snížena. Patří sem například geny pro H<sup>+</sup> ATPázy *PMA1* a *PMA2* (Palkova, Devaux et al. 2002).

## 2.5. Diferenciace kvasinkových kolonií

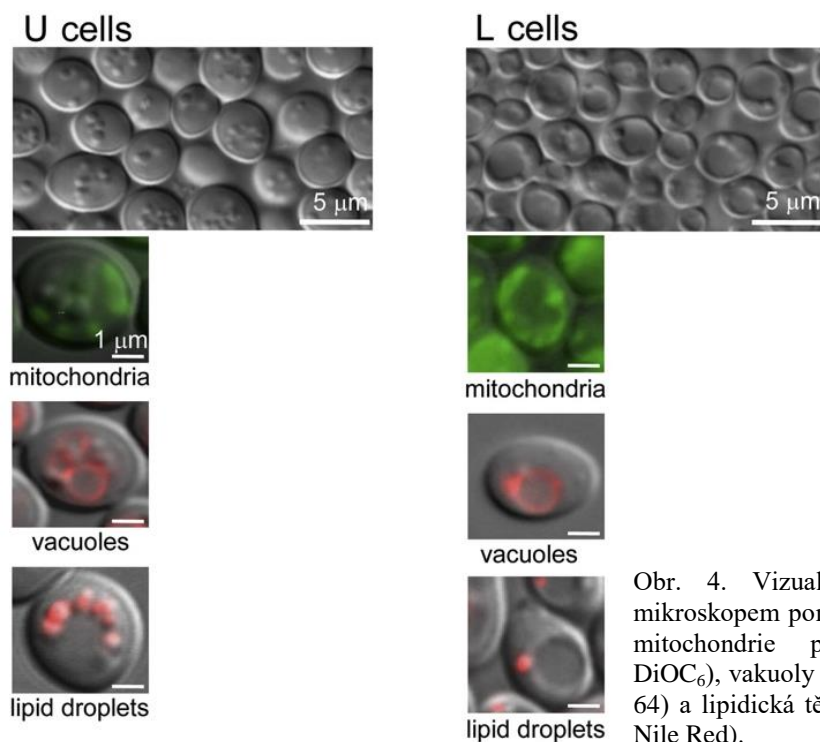
Pokud probíhá vývoj kvasinkových kolonií standardně, tak během alkalizace vznikají specializované diferencované buňky, které jsou v kolonii specificky rozmístěny. Díky těmto specializovaným buňkám má kolonie větší šanci přežít v nepříznivých podmínkách (Palkova 2004, Palkova and Vachova 2006). Diferencované buňky u *S. cerevisiae* se dělí na tři typy. Jsou to takzvané horní U buňky („Upper cells“) ležící v horních vrstvách kolonie, spodní L buňky („L cells“) z vnitřní oblasti kolonie a okrajové O buňky („Outer cells“) nacházející se

v okrajových oblastech kolonie. U buňky se jeví jako větší zdravé buňky. Spodní L buňky naopak vypadají jako typické stresované buňky se sníženou životaschopností (Cap, Stepanek et al. 2012). O buňky nejsou předmětem mé diplomové práce, proto se o nich dále nebudu zmiňovat.

<i>Rozdíly mezi buňkami</i>	<i>U buňky</i>	<i>L buňky</i>
<b>Velikost buněk</b>	Relativně velké	Malé
<b>Mitochondrie</b>	Větší, téměř bez krist	Velký počet malých, dobře vyvinuté kristy
<b>Lipidická tělíska („lipid droplets“)</b>	Více větších tělísek	Jedno malé tělísko
<b>Vakuola</b>	Množství malých vakuol	Jedna velká vakuola
<b>Náchylnost ke stresu</b>	Odolné	Náchylné

Tab. 1. Některé rozdíly vlastností U a L buněk  
Informace převzaty z (Cap, Stepanek et al. 2012)

Tab. 1 ukazuje některé základní rozdíly mezi U a L buňkami. Zajímavým rozdílem jsou mitochondrie. U buňky mají větší mitochondrie, které nemají téměř žádné kristy. S tím souvisí nízká aktivita respirace těchto buněk. Oproti tomu L buňky mají mnoho menších mitochondrií s dobře vyvinutými kristami. Zde tedy dobře probíhá respirace. V L buňkách se díky vyšší aktivitě mitochondrií produkuje i vyšší množství ROS, tedy reaktivních molekul obsahujících kyslík (reactive oxygen species), než v U buňkách. U buňky se oproti L buňkám chovají jako metabolicky aktivní zdravé buňky. Mají spuštěné signální dráhy spojené s kontrolou živin (např. TOR, PKA). Kromě toho, že neobsahují téměř žádné ROS, umí se také lépe vypořádat s okolními stresy než L buňky. To jim zajišťuje schopnost delšího přežívání v kolonii. L buňky jsou podobné spíše hladovějícím buňkám (Cap, Stepanek et al. 2012).



Obr. 4. Vizualizace U a L buněk pod mikroskopem pomocí kontrastu Nomarski. Dále mitochondrie pod fluorescencí (obarvené DiOC<sub>6</sub>), vakuoly pod Nomarski (obarvené FM4-64) a lipidická tělíška pod Nomarski (obarvená Nile Red).  
(Cap, Stepanek et al. 2012)

Přestože se L buňky diferencují v dolní části kolonie a jsou tak na pevném médiu blíže živinám, je jejich růst na rozdíl od U buněk zablokován. Naproti tomu U buňky vykazují metabolické a morfologické parametry rostoucích zdravých buněk. V regulaci diferenciace se podílí amoniak produkovaný v alkalické fázi jako signální molekula (Palkova, Janderova et al. 1997, Cap, Stepanek et al. 2012). Kromě amoniaku mohou tento jev ovlivňovat i další nízkomolekulární metabolity, které jsou vylučovány kvasinkami, jako takzvané odpadní metabolické produkty (Dickinson 1996).

### 2.5.1. L buňky vyživující U buňky

U buňky, jakožto metabolicky aktivní buňky, spotřebují mnoho živin pro své náročnější metabolické procesy. Bylo zjištěno, že u L buněk jsou spouštěny naopak degradační procesy proteinů a lipidů, ze kterých vznikají nízkomolekulární metabolity použitelné jako výživa pro U buňky. L buňky mají také spuštěné enzymy a exprimují geny potřebné k syntéze důležitých živin, aminokyselin a jejich transportérů. V koloniích tvořených kmeny s delecí zmíněných genů se ukázalo, že se životnost U buněk sníží. Zdá se tedy, že U buňky pro svůj život L buňky potřebují a v podstatě je využívají jako zdroj živin (Cap, Stepanek et al. 2012). Některé vlastnosti a regulace v U a L buňkách kolonií kvasinek se

částečně podobají vlastnostem buněk některých typů nádorů u člověka a ostatních buněk nádorem postiženého organismu, kdy U buňka se podobá nádorové buňce. Mitochondrie nádorových buněk lidských astrocytů (neuroglie) se podobají mitochondriím diferencovaných U buněk v koloniích *S. cerevisiae*. Mitochondrie nádorových astrocytů jsou zvětšené a také ztratily většinu svých krist, podobně jako u U buněk. Takové astrocyty nejsou schopny tvořit dostatečné množství energie skrze oxidativní fosforylaci a musí tedy energii čerpat jiným způsobem (Arismendi-Morillo and Castellano-Ramirez 2008) stejně jako U buňky, které získávají energii prostřednictvím glykolýzy. Díky zmíněným podobnostem by vztah U a L buněk mohl být využíván jako experimentální model pro studium některých nádorových onemocnění.

### **2.5.2. Další typy diferencovaných buněk u *S. cerevisiae***

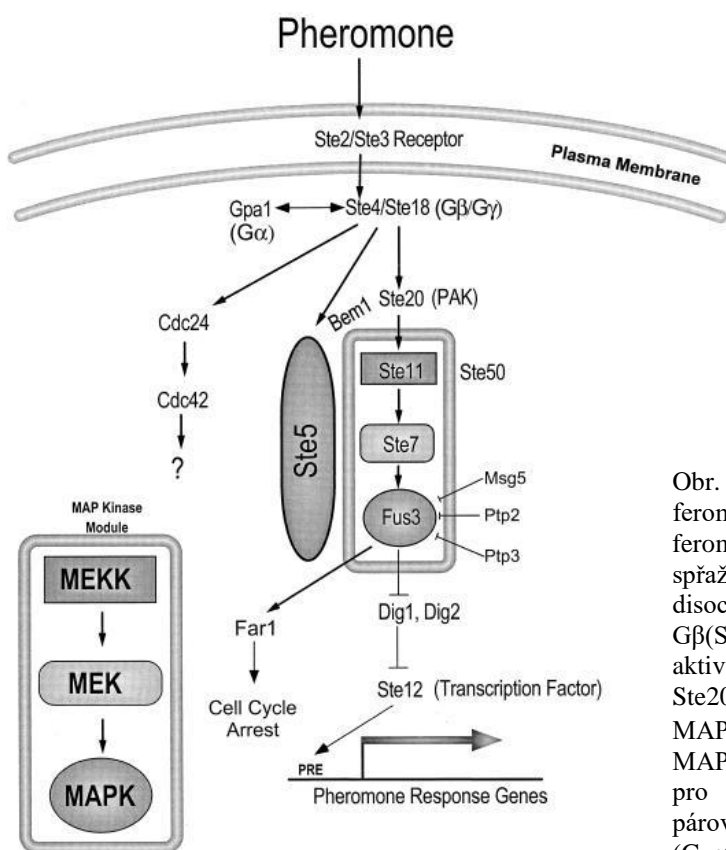
Kromě U a L buněk existují i další příklady diferencovaných buněk. Jsou to takzvané NQ („nonquiescent“) a Q („quiescent“) buňky. Jedná se o buňky klidové stacionární fáze, které vznikají v tekutých kulturách *S. cerevisiae*. Oba typy buněk se zdají být v některých vlastnostech podobné U a L buňkám. Například NQ buňky jsou méně rezistentní vůči stresům a obsahují velkou vakuolu a obsahují větší množství ROS podobně jako L buňky. Q buňky jsou vůči stresům více rezistentní, nemají velké množství ROS, ale od U buněk se liší jednak svoji metabolickou aktivitou, jednak tím, že jsou respiračně aktivní (Allen, Buttner et al. 2006). Diferencované buňky na pevném i v tekutém médiu se obecně nazývají „Elders“. Elders jsou tedy všechny kvasinkové buňky, které se dále nedělí, jsou diferencované a prožívají chronologické stárnutí způsobené vnějšími podmínkami (Palkova, Wilkinson et al. 2014).



## 2.6. Jiné typy komunikace a signalizace u *S. cerevisiae*

### 2.6.1. Komunikace pomocí feromonů

Signalizační dráha určená k párování kvasinek je jednou z nejznámějších signálních drah u *S. cerevisiae*. Jedná se o signalizaci mezi buňkami pomocí feromonů (signálních molekul), které vedou ke vzniku diploidu. Párování se účastní takzvané párovací typy haploidních kvasinek MATa a MAT $\alpha$ . Každý typ má svůj feromon (MATa – feromon a, MAT $\alpha$  – feromon  $\alpha$ ), který účinkuje na druhý typ v podobě zastavení cyklu a následnou synchronizaci buněčného cyklu vedoucí ke konjugaci (Hartwell 1980).



Obr. 5. Signální dráha k odpovědi na feromon a MAPK kaskáda. Navázáním feromon aktivuje receptor (Ste2/Ste3) spřažený s G proteinem, tím dojde k disociaci G proteinu a uvolní se tak G $\beta$ (Ste4p)-G $\gamma$ (Ste18p) komplex, který aktivuje downstream proteiny Ste5p a Ste20p; ty následně stimulují aktivaci MAPK kaskády (Ste11p-Ste7p-Fus3p). MAPK kaskáda dále aktivuje další cíle pro spuštění a průběh správného párování. (Gustin, Albertyn et al. 1998)

Na obrázku 5 je popsána dráha spuštěná navázáním feromonu jednoho párovacího typu na receptor kvasinky druhého párovacího typu. Spuštěná MAPK kaskáda poté spouští geny, které vedou k polarizovanému růstu proti párovacímu partnerovi, zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a zvýšené expresi genů pro proteiny nezbytné pro jadernou fúzi a k celkové fúzi buňky. Proces je řízen výše uvedenými MAT lokusy, které se vyskytují na třetím chromozomu u *S. cerevisiae*. MAT lokusy kódují transkripční faktory specifické pro expresi

genů daného párovacího typu. Jsou to geny pro feromon, konjugační receptor pro feromon opačného párovacího typu a sestřihové faktory pro vznik funkčního feromonu (Gustin, Albertyn et al. 1998).

## 2.6.2. Signální dráhy regulované živinami

Mezi důležité signální kaskády patří ty, které jsou v kvasinkách regulované množstvím živin. Využívají extracelulárního signálu podobně jako dráha regulovaná feromony. V případě kolonií některé tyto dráhy reagují na vstup kolonie do alkalické fáze a účastní se buněčné diferenciace (Palkova, Janderova et al. 1997, Cap, Stepanek et al. 2012). Signální dráhy regulované živinami mohou kontrolovat růst buňky, metabolismus nebo reakci na stres. Pomáhají buňce a případně celé populaci adaptovat se na změny v prostředí. Pokud je v okolí nedostatek živin, metabolické dráhy se změní a populace buněk přejde do klidové fáze a čeká zde na období, kdy bude živin opět dostatek. Po obnovení přísunu živin signální dráhy navrátí buňku do aktivní růstové fáze. Známé signální dráhy regulované živinami jsou nazvané podle kináz, které je řídí - Snf1, PKA, Sch9, Tor1 a PHO dráha (Smets, Ghillebert et al. 2010). S některými drahami dále krátce čtenáře seznámím.

Signální dráha Snf1 kontroluje množství živin glukózy v médiu. Snf1p je serin/threonin kináza, která při ideálním množství glukózy není aktivní. Snf1p je heterotrimerní komplex skládající se z katalytické  $\alpha$  podjednotky (Snf1p), regulační  $\beta$  podjednotky (Gal83p, Sip1p nebo Sip2p) a druhé regulační  $\gamma$  podjednotky (Snf4p) (Yang, Jiang et al. 1994). Pokud dojde ke snížení množství glukózy v médiu, dochází k aktivaci fosforylací Snf1p kinázy. K aktivaci je potřeba celý komplex podjednotek, z nichž největší roli má aktivační podjednotka Snf4p (Jiang and Carlson 1996). V kaskádě je pomocí kinázy Snf1p fosforylován transkripční represor Mig1p, který se po fosforylaci vyváže z komplexu inhibujícího dráhu glukózy a díky tomu dochází k přepnutí z fermentace na respiraci (Smith, Davies et al. 1999). Inhibice glukózou se nazývá katabolická represe. Přítomnost glukózy zabraňuje možnost využití alternativních zdrojů uhlíku (Gancedo 1998).

Metabolismus, proliferaci nebo odpověď na stres reguluje cAMP-PKA dráha. Protein kináza A (PKA) je heterotetramer obsahující dvě katalytické podjednotky (alternativně kódované geny *TPK1*, *TPK2*, *TPK3*) a dvě regulační podjednotky (kódované genem *BCY1*)

(Toda, Cameron et al. 1987). Hlavní roli v regulaci cAMP-PKA dráhy má dostupný zdroj uhlíku. Pokud dojde ke změně v množství zdroje uhlíku, a to především glukózy nebo jiného zkvasitelného zdroje, dráha na tuto změnu zareaguje. Malé G – proteiny Ras1p a Ras2p aktivují adenylátcyklázu Cyr1p a ta katalyzuje vznik cAMP (Casperson, Walker et al. 1983). Zvýšená hladina cAMP následně odstraní regulační podjednotku z komplexu a tím aktivuje kinázu PKA. PKA poté reguluje řadu dalších genů vedoucí k adaptaci na daný zdroj uhlíku (Thevelein, Cauwenberg et al. 2000).

Na kontrole živinami se podílí také Sch9 Ser/Thr protein kináza z rodiny AGC (rodina cytoplasmatických serin/threonin proteinkináz nazvaná podle proteinkináz PKA, PKG a PKC). Sch9 kináza je velmi důležitá ke správnému růstu buňky podobně jako PKA. Pomocí experimentů byly zjištěny určité podobnosti v regulaci růstu buněk pomocí PKA a Sch9 kinázy. Při delecí genu pro Sch9 kinázu dochází ke zpomalení růstu buněk, a dokonce delece genu *SCH9* může být pro buňku letální. Zdá se, že PKA a Sch9 se ve své roli prolínají. Obě kinázy jsou aktivní při zvýšeném množství cAMP (Crauwels, Donaton et al. 1997). Důležitá role Sch9 je v regulaci růstového potenciálu buněk prostřednictvím dostupnosti živin. Sch9 se chová jako jeden z hlavních komponentů regulovaných dráhou TORC1 (Jorgensen, Rupeš et al. 2004, Urban, Soulard et al. 2007).

Dráha Ser/Thr protein kinázy TOR (Target of rapamycin) kontroluje buněčný růst a je známa nejen u kvasinek, ale i u mnoha jiných organismů včetně savců. U kvasinek rozlišujeme dva typy TOR drah. Dráhy obsahují dva odlišné komplexy TORC1 a TORC2. Na regulaci TOR komplexů se podílejí dva proteiny Tor1p a Tor2p. Základní rozdíl mezi oběma druhy drah je, že pouze komplex TORC1 podléhá inhibici rapamycinem (Zheng, Fiorentino et al. 1995). Navíc TORC2 se stará spíše o regulaci buněčné polarity, tedy organizaci aktinového cytoskeletu (Schmidt, Kunz et al. 1996, Inoki, Ouyang et al. 2005). O TORC1 existují jasnější fakta právě díky možnosti inaktivace komplexu rapamycinem. Rapamycin se chová jako silný inhibitor spouštějící katabolické procesy v buňce. Po přidání rapamycinu k buňkám dojde k úplnému zastavení buněčného cyklu a vstupu do G<sub>0</sub> fáze (De Virgilio and Loewith 2006). TORC1 se zapojuje do regulace metabolismu dostupných dusíkových zdrojů, zprostředkovává negativní kontrolu dráhy spojené s metabolismem aminokyselin (Hinnebusch 2005), podílí se na dráze RTG („retrograde response pathway), která se stará například o biosyntézu glutamátu u buněk rostoucích na chudém médiu a zprostředkovává regulaci mezi mitochondriemi a jádrem (Liu and Butow 2006). TORC1 dále negativně

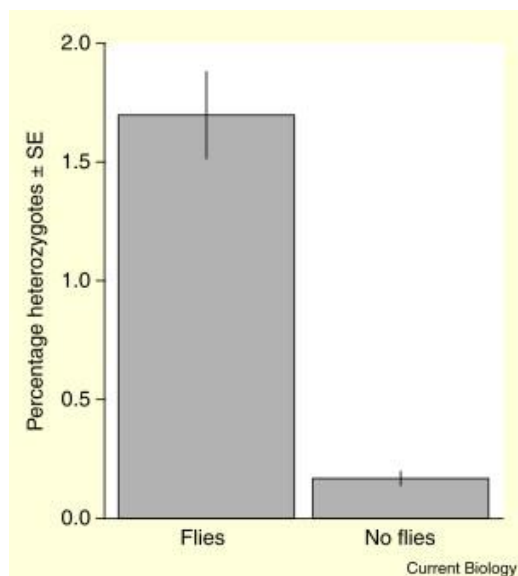
reguluje autofagii (Chang, Juhász et al. 2009) nebo vystupuje jako dvojitý regulátor kontrolující transkripci genů kódujících proteiny pro odpovědi na stres (Smets, Ghillebert et al. 2010).

Poslední signální dráhou regulovanou živinami, kterou zde krátce popíši, je dráha PHO. O dráhu se stará Pho85 cyklin – dependentní kináza. PHO dráha pomáhá buňce reagovat na změny v množství fosfátů ať už přímo v buňce nebo v extracelulárním okolí. Kontrolu zajišťuje pomocí Pho85p – Pho80p komplexu. Další proteiny, které se podílejí na regulaci, jsou transkripční aktivátory Pho2p, Pho4p a CDK inhibitor Pho81p (Ogawa, Noguchi et al. 1995, Ogawa 2000). Dráha reguluje expresi genů *PHO*. Pho85p – Pho80p komplex je aktivní pouze pokud má buňka dostatečné množství fosfátů tehdy je inhibitor Pho81p inaktivní a dochází k repressi *PHO* genů důležitých pro příjem fosfátů. Zmíněný komplex fosforylací inhibuje Pho4p, který je důležitý pro aktivaci exprese genů *PHO*. Pokud je fosfátů málo, tak se komplex inhibuje pomocí Pho81p a dochází k aktivaci Pho4p, který aktivuje expresi *PHO* genů (Kaffman, Rank et al. 1998, Ogawa 2000).

### 2.6.3. Komunikace mezi kvasinkami a hmyzem

Kromě mezibuněčných komunikací existují i komunikace mezi mikroorganismy a jinými organismy. Mikroorganismy v přírodě mohou kolonizovat různé typy rostlin. Aby se mikroorganismy na rostlinách mohly rozšiřovat, potřebují nalákat přenašeče, kteří je dále šíří. K tomu účelu mikroorganismy používají různé typy těkavých látek, kterými lákají drobný hmyz a ten se tak stává jejich přenašečem na další rostlinný habitat (Arguello, Sellanes et al. 2013). Některé mikroorganismy (bakterie a houby) dokonce mohou vnutit rostlině, aby sama vysílala signální těkavé látky pro přenašeče nebo látky ovlivňující růst a vývoj rostliny (auxiny a cytokininy). Vztah mezi rostlinou a mikroorganismem může být oboustranně výhodný nebo také parazitický (Bais, Park et al. 2004, Ortíz-Castro, Contreras-Cornejo et al. 2009). U kvasinek *S. cerevisiae* je tento typ signální komunikace mezi organismy také znám. Pro transport kvasinkových spor *S. cerevisiae* z plodů rostlin je důležitým přenašečem Octomilka neboli *Drosophila melanogaster* (Reuter, Bell et al. 2007). U všech kvasinek je známo, že v přírodě mohou být přenášeny pomocí hmyzu (Gilbert 1980). Celý vztah mezi *D. melanogaster* a *S. cerevisiae* se zdá být oboustranně výhodný, neboť pro Octomilku jsou rostlinné plody výborným zdrojem potravy a pro kvasinky je Octomilka šancí k disperzi jejich

spor, čímž se zvyšuje genetická variabilita kvasinkového kmene. Zamezuje se tak inbreedingu neboli křížení mezi příbuznými jedinci, což vede ke snížení množství heterozygotů a snížení adaptační schopnosti v populaci (Reuter, Bell et al. 2007).



Obr. 6. Graf zobrazující efekt *D. Melanogaster* na zvýšení genetické variability *Saccharomyces cerevisiae*. Vlevo s přítomností *D. Melanogaster*, vpravo bez přítomnosti. (Reuter, Bell et al. 2007)

Jaké látky využívá *S. cerevisiae* jako signální molekuly, které mohou přitahovat *D. melanogaster*? Patří sem kyseliny, estery a alkoholy s krátkým řetězcem. Nejvíce se objevuje 3 – methylbutanol, dále látky vzniklé esterifikací ethanolu nebo 2 – phenylethanolu. V malém množství se objevují méně známé látky jako například seskviterpen nerolidol a další. Jak se ukázalo, pro Octomilky je nejvíce atraktivní kyselina octová a acetoin. Pro další nalezené látky je role v tomto vztahu stále předmětem zkoumání. (Arguello, Sellanes et al. 2013).

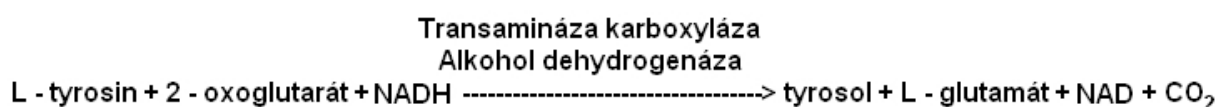
#### 2.6.4. Ehrlichova dráha

Poslední částí kapitoly signalizačních drah bude mít největší prostor. Zaměřím se na samotnou dráhu a její metabolity, které jsou velmi důležité pro moji diplomovou práci. Kvasinky během fermentace produkují ethanol a oxid uhličitý. Nejsou to však jediné produkované látky. Při fermentaci vznikají i další meziprodukty, takzvané „odpadní látky“ – alkoholy a kyseliny. Odpadní látky jsou výsledkem katabolické dráhy aminokyselin, kterou poprvé popsal v roce 1907 německý biochemik Felix Ehrlich. Alkoholy a kyseliny byly pojmenovány jako „fusel alcohols a fusel acids“, což v českém překladu znamená odpadní alkoholy a kyseliny. (Ehrlich 1907). Jedná se o vyšší aromatické a alifatické alkoholy a různé druhy kyselin se specifickým zápachem. Tyto nízkomolekulární metabolity Ehrlichovy dráhy

jsou zásadní pro potravinářský průmysl a biotechnologii, zejména při výrobě nápojů a jiných potravin. Při výrobě piva a vína dodávají nápoji specifickou vůni a chuť, takzvaný buket. Jedním z produktů Ehrlichovy dráhy je u *S. cerevisiae* aromatický alkohol 2 – phenylethanol důležitý v potravinářství nebo spotřebním průmyslu pro svoji příchut' a vůni. 2 - phenylethanol má vůni připomínající růže a je díky této vlastnosti velmi často používán v parfumerii a kosmetice (Etschmann, Bluemke et al. 2002). Výhodou nízkomolekulárních metabolitů Ehrlichovy dráhy je jejich přírodní původ, i proto jsou oblíbené v potravinářském a spotřebním průmyslu.

#### 2.6.4.1. Nalezení mechanismu dráhy

Mechanismus Ehrlichovy dráhy byl studován od doby nalezení. Pomocí experimentů na tyrosinu byly zjištěny základní mechanismy a první kroky dráhy. Na začátku stál tyrosin, který byl v prvním kroku pomocí transaminace změněn na p – hydroxyphenylpyruvát a glutamát. Následnou dekarboxylací vznikl meziprodukt p – hydroxyphenylacetaldehyd a oxid uhličitý. Po dekarboxylaci pokračovala v dráze redukce aldehydu na výsledný alkohol - tyrosol a NADH (donor vodíku). Pomocí experimentu s tyrosinem byla sestavena vzorová rovnice (viz Obr. 7) (Sentheshanmuganathan and Elsdén 1958).

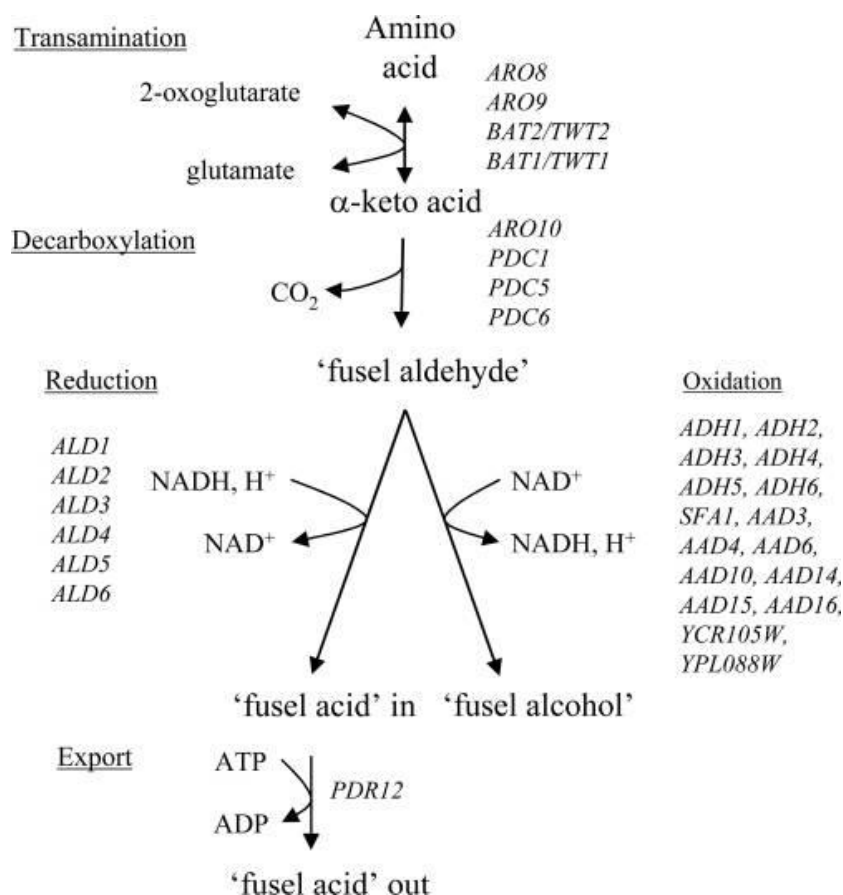


Obr. 7. Mechanismus vzniku tyrosolu.  
(Sentheshanmuganathan and Elsdén 1958)

O něco později bylo pomocí experimentů na *S. cerevisiae* dokázáno, že kromě tyrosinu do katabolické dráhy vstupuje více aminokyselin. Ze všech aminokyselin v katabolické dráze vznikají aromatické alkoholy nebo kyseliny. Dráha byla popsána u aspartátu, leucinu, isoleucinu, valinu, norvalinu, methioninu, phenylalaninu a tryptofanu. Tyto aminokyseliny byly přeměněny na 2 – oxoglutarát, což patří k prvnímu kroku Ehrlichovy dráhy (Sentheshanmuganathan 1960).

Aby se dokázalo, že Ehrlichova dráha má opravdu zásadní význam pro katabolismus aminokyselin, bylo třeba dalších experimentů. Provedlo se několik testů, kdy kultury *S.*

*cerevisiae* rostly na minimálním médiu s určitou aminokyselinou, která byla specificky značena uhlíkem  $^{13}\text{C}$  jako jediným zdrojem živin. Poté se testy vyhodnocovaly pomocí  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopie. Testy se prováděly na leucinu, valinu, phenylalaninu, tryptofanu a methioninu (Dickinson, Lanterman et al. 1997, Dickinson, Harrison et al. 2000, Dickinson, Salgado et al. 2003). Výsledky testů přinesly hlubší pochopení Ehrlichovy dráhy a identifikovaly také některé proteiny, které se dráhy účastní. Pro katabolismus phenylalaninu (vznik 2 – phenylethanolu) a tryptofanu (vznik tryptofolu) byla zjištěna stejná dráha, ale velmi rozdílná oproti jiným katabolismům stejných aminokyselin u jiných druhů kvasinek než je *S. cerevisiae*. Například u *Trichosporon cutaneum* končí katabolická dráha tryptofanu u 3 – ketoadipátu (Anderson and Dagley 1981). Tento výsledek nekoresponduje s Ehrlichovou dráhou, kde vznikají alkoholy nebo kyseliny. Během studia Ehrlichovy dráhy u *S. cerevisiae* nebyl pozorován žádný z meziproductů katabolických drah aminokyselin identifikovaných u *T. cutaneum* či dalších druhů kvasinek. Phenylalanin i tryptofan procházel dekarboxylací pomocí dekarboxyláz Pdc1p, Pdc5p nebo Pdc6p. U jiných aminokyselin jako je například leucin nebo isoleucin jsou k dekarboxylaci potřebné i jiné dekarboxylázy. Z toho vyplývá, že průběh dráhy u *S. cerevisiae* může být pro každou aminokyselinu trochu rozdílný, avšak na konci vždy vznikají „odpadní“ alkoholy nebo kyseliny (Dickinson, Salgado et al. 2003). Další nalezené důležité enzymy jsou alkoholdehydrogenázy kódované geny *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5* a *SFA1*. Tyto alkoholdehydrogenázy jsou přímo esenciální pro vznik alkoholů s dlouhým řetězcem a tedy i pro poslední kroky Ehrlichovy dráhy u *S. cerevisiae* (Dickinson, Salgado et al. 2003). Známé geny kódující enzymy zapojené do Ehrlichovy dráhy jsou vyznačeny na prozatím finálním schématu Ehrlichovy dráhy (viz Obr. 8).



Obr. 8. Schéma Ehrlichovy dráhy. Katabolická dráha aminokyselin vedoucí ke vzniku odpadních („fusel“) alkoholů a kyselin. Touto drahou jsou degradovány aminokyseliny s alifatickým postranním řetězcem (leucin, valin, isoleucin), aminokyseliny se sírou v postranním řetězci (methionin), aminokyseliny s aromatickým jádrem (phenylalanin, tryptofan, tyrosin). Schéma také zobrazuje známé geny kódující enzymy nezbytné pro biochemické procesy (transaminace, dekarboxylace, redukce a oxidace) Ehrlichovy dráhy. (Hazelwood, Daran et al. 2008)

#### 2.6.4.2. Procesy Ehrlichovy dráhy

Ehrlichova dráha má tři fáze – transaminace, dekarboxylace a redukce či oxidace v závislosti na vzniku alkoholu nebo kyseliny (viz Obr. 8). Transaminace je prvním krokem, kdy dochází k přenosu aminoskupiny na 2 – oxokyselinu ( $\alpha$  – ketokyselinu). Transaminace v Ehrlichově dráze se účastní různé typy aminotransferáz jako například aromatické aminotransférázy *Aro8p* a *Aro9p*, které hrají roli v degradaci tryptofanu, phenylalaninu a tyrosinu (Hazelwood, Daran et al. 2008). Další částí dráhy je dekarboxylace  $\alpha$  – ketokyseliny za vzniku aldehydu (některé příklady dekarboxyláz jsou již popsány výše). V novějších studiích byla ukázána důležitá role karboxylázy *Aro10p* dokonce i v regulaci (Vuralhan, Lutik et al. 2005). Posledním krokem dráhy je redukce aldehydu na alkohol nebo oxidace na kyselinu. Ve větší míře se vyskytuje tvorba alkoholů. Bylo zjištěno, že na množství produkce



kyselin a alkoholů mají vliv také kultivační podmínky. Během studií, při nichž kultury rostly na médiu s limitovanou glukózou, se ve větší míře produkovaly kyseliny. Naopak v kulturách rostoucích na médiu s bohatým množstvím glukózy vznikaly na konci dráhy častěji alkoholy. Na bohatém glukózovém médiu převládala fermentace a vznikala zde směs alkoholů i kyselin. Ovšem kyseliny se produkovaly pouze z 10% (Vuralhan, Luttik et al. 2005, Boer, Tai et al. 2007).

Aminokyselina	$\alpha$ -Ketokyselina	Aldehyd	Odpadní alkohol	Odpadní kyselina
<b>Leucin</b>	$\alpha$ -Ketoisokaproát	Isoamylaldehyd	Isoamylalkohol	kys. isovalerová
<b>Isoleucin</b>	$\alpha$ -Ketomethylvalerát	2 – methylbutanal	2 - methylbutanol	kys. methylvalerová
<b>Phenylalanin</b>	Phenylpyruvát	2 – phenylethanal	2 - phenylethanol	2 - phenylacetát
<b>Tryptophan</b>	3 – indolpyruvát	3 – indolacetaldehyd	Tryptophol	2 - (indol-3-yl) ethanoát

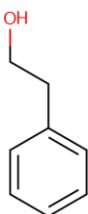
Tab. 2. Meziprodukty a produkty Ehrlichovy dráhy pro některé aminokyseliny. Žlutě jsou vyznačeny studované odpadní alkoholy a kyseliny. (Hazelwood, Daran et al. 2008)

V tab. 2 jsou uvedeny meziprodukty/produkty Ehrlichovy dráhy pro vybrané aminokyseliny. Vidíme zde meziprodukty, které vznikají během jednotlivých kroků katabolické dráhy aminokyselin až do konečného formování alkoholu nebo kyseliny.

### 2.6.4.3. Významné látky Ehrlichovy dráhy

V poslední kapitole přehledu literatury blíže seznámím čtenáře s některými látkami vznikajícími prostřednictvím Ehrlichovy dráhy.

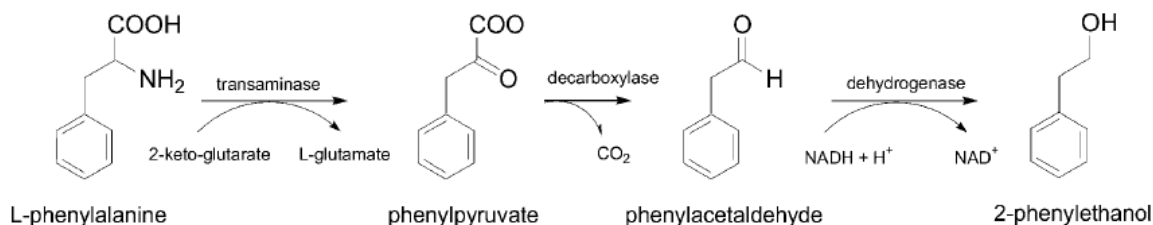
#### 2 – phenylethanol



Obr. 9. Strukturální vzorec 2 – phenylethanolu

Zdroj: <http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB01072>

2 – phenylethanol je vyšší aromatický alkohol vznikající v Ehrlichově dráze z phenylalaninu (Sentheshanmuganathan 1960, Hazelwood, Daran et al. 2008). Pro biotechnologii, potravinářský a kosmetický průmysl je nezbytným přírodním doplňkem. Hojně se využívá například v pekařství, ve výrobě alkoholických nápojů nebo v kosmetice pro svou vůni podobnou růžím. 2 – phenylethanol se vyskytuje také běžně v přírodě, avšak v příliš malém množství na to, aby se mohl získávat pro průmysl. Tuto látku nalezneme v některých kvetoucích rostlinách, jako jsou růže, narcisy, hyacinty a další. Vzhledem ke složitosti získávání látky z přírodního prostředí se využívají k produkci 2 – phenylethanolu právě kvasinky (Etschmann, Bluemke et al. 2002). Bylo objeveno několik drah, které vedou k jeho tvorbě, jako například dráha cinnamátu u *Rhodotorula glutinis* (Large 1986). Nejvíce efektivní z hlediska produkce se ale jeví právě Ehrlichova dráha, kde dochází k transaminaci phenylalaninu (viz Obr. 10) (Etschmann, Bluemke et al. 2002).

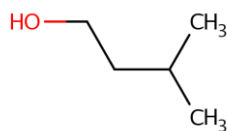


Obr. 10. Ehrlichova dráha pro phenylalanin za vzniku 2 – phenylethanolu. (Etschmann, Bluemke et al. 2002)

2 – phenylethanol je pro potravinářský průmysl tak cenný, že byly vytvořeny mutantní kmeny *S. cerevisiae*, které produkují větší množství 2 – phenylethanolu než kmeny obyčejné.

K selekci těchto speciálních kmenů se používá p - fluoro – DL – phenylalanin, což je toxický analog L – phenylalaninu. Tento toxin blokuje DAHP syntázu („3–deoxy–D–arabino–heptulosonate–7-phosphate synthase“) kódovanou *ARO4*, zodpovědnou za regulaci biosyntézy phenylalaninu. Kmeny *S. cerevisiae* s rezistencí proti toxinu mají zvýšenou aktivitu DAHP syntázy. Vzniká tak více phenylalaninu, který je dále katabolizován za vzniku většího množství 2 – phenylethanolu (Fukuda, Watanabe et al. 1991, Duenas-Sanchez, Perez et al. 2014).

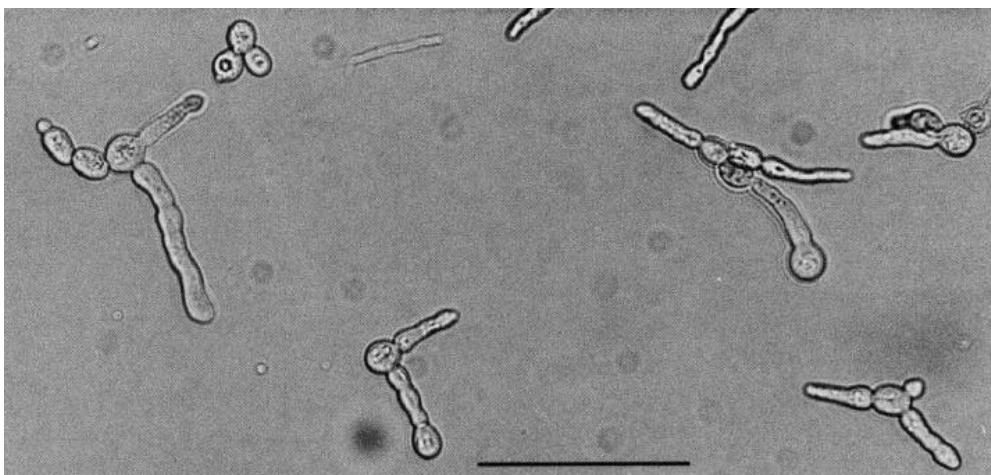
### Isoamylalkohol



Obr. 11. Strukturální vzorec isoamylalkoholu  
Zdroj: <http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB00570>

Isoamylalkohol, systematický název 3 – methylbutanol, je alifatický primární alkohol. V Ehrlichově dráze u *S. cerevisiae* vzniká degradací leucinu. Jeho strukturálním izomerem, který je také známý z Ehrlichovy dráhy, je 2 – methylbutanol neboli aktivní amylalkohol. Ten však vzniká degradací isoleucinu (Sentheshanmuganathan 1960, Hazelwood, Daran et al. 2008). Isoamylalkohol se podobně jako 2 – phenylethanol hojně využívá v potravinářském průmyslu. Jeho největší využití je v pivovarnictví pro jeho sladové aroma. Kromě piva se přidává také do vín, dalších lihovin nebo ciderů. Isoamylalkohol může být převeden na ester isoamylacetát. Isoamylacetát patří mezi estery, jejichž směs přispívá ke konečné chuti piva, proto je isoamylalkohol pro tvorbu esteru důležitý. K tvorbě esterů jsou potřebné specifické esterázy. Isoamylacetát má banánové aroma a široce se používá i v dalších potravinářských odvětvích (Peddie 1990, Quilter, Hurley et al. 2003).

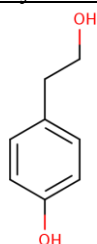
Zajímavou vlastností isoamylalkoholu je jeho schopnost měnit morfologii buněk *S. cerevisiae*. Při jeho přítomnosti v médiu dochází k přepnutí růstu v podobě oválných buněk na filamentární růst, který je jinak typický pro patogenní kmeny kvasinek jako je *Candida albicans*. Při experimentech na YEPD médiu s isoamylalkoholem bylo pozorováno několik změn. První změnou bylo celkové zpomalení růstu buněk vystavených isoamylalkoholu oproti kontrole bez této látky. Po delší době došlo k přepnutí na pseudohyální růst a k tvorbě filament (viz Obr. 12). Ideální koncentrace pro tvorbu filament se ukázala okolo koncentrace 0,5% isoamylalkoholu v tekutém médiu (Dickinson 1996, Kern, Nunn et al. 2004).



Obr. 12. Pseudohyfální růst buněk *S. cerevisiae* vystavených isoamylalkoholu při koncentraci 0,5% (Dickinson 1996)

Buňky vystavené isoamylalkoholu také zvýšily aktivitu mitochondriální sukcinátdehydrogenázy oproti kontrole. Tato změna byla způsobena zvýšenou produkcí mitochondrií v buňkách v přítomnosti isoamylalkoholu. Isoamylalkohol také způsoboval změny v buněčné stěně. U buněk vystavených isoamylalkoholu se objevila zvýšená produkce chitinu a tím zesílení stěn. Zesílení se potvrdilo při přidání lytikázy (endonukleázová a proteázová aktivita při lýzi kvasinek), kdy buňky v přítomnosti isoamylalkoholu byly vůči lytikáze mnohem více rezistentní právě díky silnějším stěnám (Kern, Nunn et al. 2004). Podobně jako u *S. cerevisiae* vystavené isoamylalkoholu se objevují zesílené rezistentní stěny i u patogenní filamentární formy *Candidy albicans* (Braun and Calderone 1978).

### Tyrosol



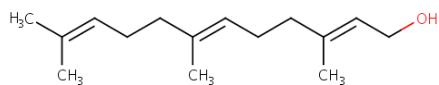
Obr. 13. Strukturální vzorec tyrosolu  
Zdroj: <http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB01798>

Mezi další studované látky této dráhy patří tyrosol vznikající z tyrosinu. Alkohol, jehož vznik pomohl k pochopení procesů Ehrlichovy dráhy. V přírodě se kromě kvasinek tyrosol vyskytuje v olivovém oleji (Sentheshanmuganathan and Elsdon 1958). V dalších studiích bylo zjištěno, že se tyrosol chová jako významný antioxidant. U lidských keranocytů

může přítomnost tyrosolu zabraňovat jejich apoptóze indukované UVB zářením (typ UV záření se středně dlouhou vlnovou délkou, tj. 280 – 315 nm). Tyrosol snižuje oxidativní stres vyvolaný tímto typem záření (Salucci, Burattini et al. 2015). Olivový olej se ve stravě uplatňuje jako směs několika antioxidantů jako jsou flavonoidy, lignany a právě phenoly, mezi které patří i tyrosol a hydroxytyrosol. Kromě ochrany kůže mají tyto látky preventivní vliv proti některým typům nádorů jako je rakovina prsou nebo kolorekta (tlusté střevo, konečník) (Owen, Giacosa et al. 2000). U savců tyrosol společně s dalšími látkami olivového oleje zabraňují například oxidaci LDL, která může vést ke vzniku volných radikálů a tím i k poškození dané buňky (Wiseman, Mathot et al. 1996, Giovannini, Straface et al. 1999).

U kvasinek hraje tyrosol zcela rozdílnou roli. Známý lidský kvasinkový patogen *Candida albicans* způsobující kandidózy potřebuje tyrosol jako jeden z hlavních faktorů virulence. Je známo, že patogenita *C. albicans* souvisí s přepnutím růstu této kvasinky na pseudohyfální růst. Pseudohyfální růst se aktivuje při nižší hustotě buněk s prvním stupněm známým jako tvorba „germ tubes“ (Odds 1988). Při vyšší hustotě buněk je proces blokován jinou látkou Ehrlichovy dráhy farnesolem (více viz níže). V takovém případě zůstávají buňky ve své normální buněčné podobě (Hornby, Jensen et al. 2001, Ramage, Saville et al. 2002). Proces přepínání na hyfální růst je tedy regulován hustotou buněk společně se signalizací pomocí farnesolu a naopak tyrosolu, který se v pozdějších publikacích ukazuje jako spouštěcí faktor tvorby germ tubes při nízké hustotě buněk. Tyrosol je tedy signální molekulou pro aktivaci pseudohyfálního růstu u *C. albicans* (Chen, Fujita et al. 2004).

### Farnesol



Obr. 14. Strukturální vzorec farnesolu

Zdroj: <http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB00404>

Farnesol je acyklický alkohol ze třídy seskviterpenů a není přímo znám z Ehrlichovy dráhy u *S. cerevisiae*. Farnesol byl objeven u patogenních kvasinek *C. albicans* jako signální molekula, a to především v regulaci tvorby biofilmů. Tato látka se chová jako inhibitor růstu patogenních biofilmů *C. albicans* (Hornby, Jensen et al. 2001, Ramage, Saville et al. 2002). Při experimentech s přidávaným farnesolem ke koloniím *S. cerevisiae* byla zjištěna podobná reakce kolonie jako u biofilmu *C. albicans*. Farnesol u *S. cerevisiae* i ve velmi malém

množství (25  $\mu\text{M}$ ) zastavil růst kolonie. Neovlivnil však další životaschopnost kolonie (Machida, Tanaka et al. 1999).

### Další látky Ehrlichovy dráhy

Látek vznikajících v Ehrlichově dráze je více. Další látkou dráhy je například ester phenylethylacetát obsahující aroma podobné medu. Látka velmi důležitá pro vinařství. Stejně jako 2 – phenylethanol vzniká v Ehrlichově dráze z phenylalaninu. Mezi kyseliny, které vznikají v Ehrlichově dráze, patří například kyselina isovalerová, kyselina izomáselná nebo kyselina octová (Hazelwood, Daran et al. 2008).

# 3. Materiál a metody

## 3.1. Materiál

### 3.1.1. Použité mikroorganismy

#### *Saccharomyces cerevisiae* BY4742

Laboratorní haploidní kmen ze sbírky Euroscarf tvořící hladké kolonie ( $MAT\alpha$ ,  $his3\Delta$ ,  $ura3\Delta$ ,  $leu2\Delta$ ,  $lys2\Delta$ ).

#### 3.1.1.1. Připravené kvasinkové kmeny odvozené od BY4742

Seznam připravených a použitých kvasinkových kmenů s jejich genotypy je v tab. 3.

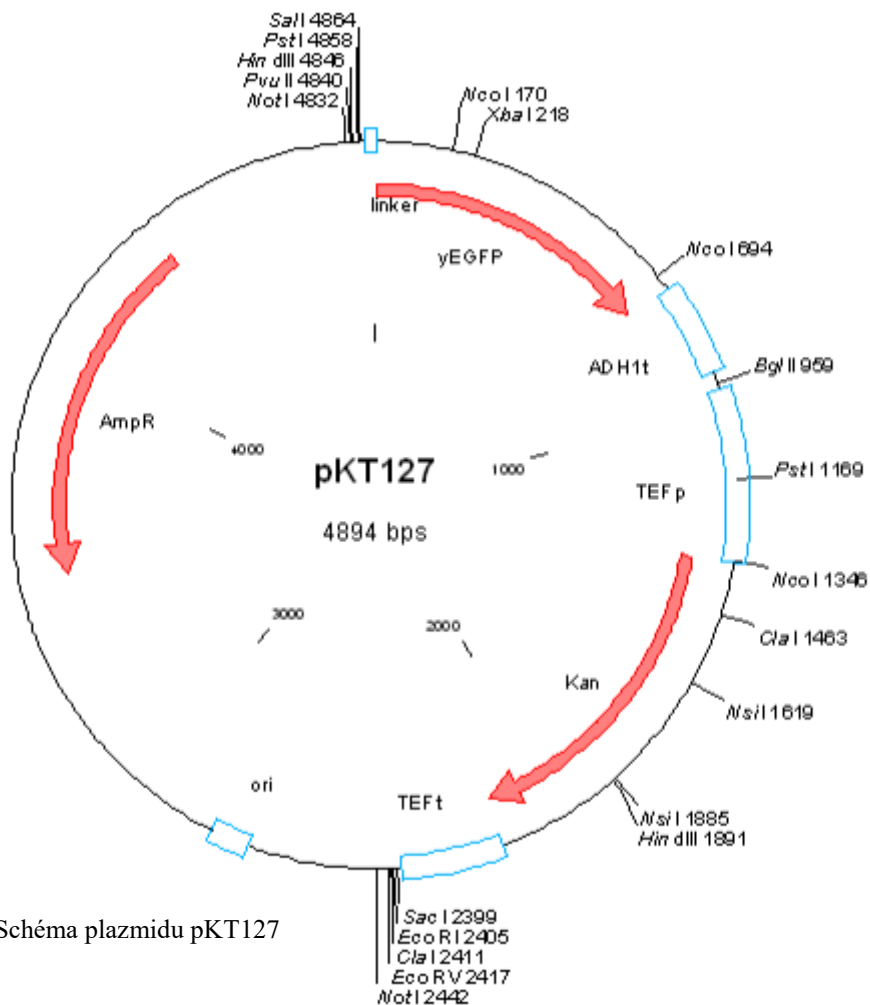
Kmen	Genotyp
<i>COX14 – GFP</i>	$MAT\alpha$ , $his3\Delta$ , $ura3\Delta$ , $leu2\Delta$ , $lys2\Delta$ , <i>COX14-yEGFP-KanMx</i>
<i>ERG28 – GFP</i>	$MAT\alpha$ , $his3\Delta$ , $ura3\Delta$ , $leu2\Delta$ , $lys2\Delta$ , <i>ERG28-yEGFP-KanMx</i>
<i>MCX1 – GFP</i>	$MAT\alpha$ , $his3\Delta$ , $ura3\Delta$ , $leu2\Delta$ , $lys2\Delta$ , <i>MCX1-yEGFP-KanMx</i>
<i>RSM26 – GFP</i>	$MAT\alpha$ , $his3\Delta$ , $ura3\Delta$ , $leu2\Delta$ , $lys2\Delta$ , <i>RSM26-yEGFP-KanMx</i>
<i>SKI8 – GFP</i>	$MAT\alpha$ , $his3\Delta$ , $ura3\Delta$ , $leu2\Delta$ , $lys2\Delta$ , <i>SKI8-yEGFP-KanMx</i>
<i>TSC13 – GFP</i>	$MAT\alpha$ , $his3\Delta$ , $ura3\Delta$ , $leu2\Delta$ , $lys2\Delta$ , <i>TSC13-yEGFP-KanMx</i>
<i>STF1 – GFP*</i>	$MAT\alpha$ , $his3\Delta$ , $ura3\Delta$ , $leu2\Delta$ , $lys2\Delta$ , <i>STF1-yEGFP-KanMx</i>

Tab. 3. Seznam připravených a použitých kvasinkových kmenů odvozených od BY4742.

\* Kmen připravila Ing. Ladislava Hatáková

### 3.1.2. Plazmidy

Jako templát pro výrobu integračních kazet, pomocí kterých se prováděla transformace kvasinkových buněk, byl použit plazmid pKT127 s rezistencí k aminoglykosidovému antibiotiku geneticin G418 (*KanMX*) (viz Obr. 15). Kazeta zabezpečila fluorescenční označení C – konce vybraných proteinů. Byl tak vytvořen fúzní protein s fluorescenčním proteinem GFP.



Obr. 15. Schéma plazmidu pKT127



### 3.1.3. Primery

Použité primery pro výrobu integračních kazet jsou uvedeny v tab. 4 a ověřovací primery pro ověření správné integrace kazety jsou v tab. 5.

#### Primery pro výrobu integračních kazet

5' → 3' – přímý primer (FWD) – 45 bp sekvence vybraného genu před stop kodonem.

3' → 5' – zpětný primer (REV) – 45 bp sekvence za stop kodonem, zpětný primer byl navržen ve směru 5' → 3', na směr 3' → 5' byl převeden pomocí programu Reverse Complement.

Na sekvenci genu navazuje dále sekvence GFP (stop kodon byl vynechán) a sekvence selekčního markeru *KanMX*.

#### Ověřovací primery

Libovolná 20 bp sekvence vybraného genu – pro správnou funkci byla vybrána sekvence s více než 50% zastoupením GC párů.

Poloha FWD a ověřovacích primerů – je dána od počátku 1000 bp upstream do začínající sekvence primeru.

Poloha REV – je dána od počátku 1000 bp upstream do poslední sekvence primeru

Do vypočtení polohy se zahrnuje i stop kodon.

Název	Poloha	Délka (v bp)	Sekvence
<i>COX14 FWD</i>	1166	63	GAAGACAATCAACAACCTGCAAAGTCCTACTGCACCTCCTA CCGAGggtgacggtgctggttta
<i>COX14 REV</i>	1258 C	63	ATCTAGTACTTTTTCTTCATTTTATTAGCACTGGGTTCTCGC AGTtcgatgaattcgagctcg
<i>ERG28 FWD</i>	1400	63	GTTTGGATGTACAAACAAAGAGAATACTACACTGGTGTTG CTTGggtgacggtgctggttta
<i>ERG28 REV</i>	1492 C	63	TCTATATAATTTTTTTTTTACAGGATATGCTTGCCCTTACATCA GAAtcgatgaattcgagctcg
<i>MCX1 FWD</i>	2516	63	TCTGCTAACATTCATACCCCAACAATTCCCAAGAGAAGCTT AACAggtgacggtgctggttta
<i>MCX1 REV</i>	2608 C	63	ATTTATTACATCTATATTTATATATTCTATAACCATTCATTTT TTTtcgatgaattcgagctcg
<i>RSM26 FWD</i>	1754	63	AATTGGTCAGTGGTAAATAATAGGATATTCTCTGGTATATC GAAGggtgacggtgctggttta
<i>RSM26 REV</i>	1864 C	63	ATAATTACATATGAGGGTAAGAGGCTATCGCTTCCTTTCTT TTCAtcgatgaattcgagctcg
<i>SKI8 FWD</i>	2147	63	TGTTTAGATAGAAGCATCAGGTGGTTTAGAGAAGCTGGCG GTAAAggtgacggtgctggttta
<i>SKI8 REV</i>	2239 C	63	GATGATTGTAAGGTTACATGCAATATATCAAGATATTACTA GAGAtcgatgaattcgagctcg
<i>TSC13 FWD</i>	1886	63	AAAAAGTATCATACCAGAAGAGCATTCTTGATTCCATTTGT ATTTggtgacggtgctggttta
<i>TSC13 REV</i>	1978 C	63	TAATATCTCTTTACCTTGCATTTGGGCATGTTGCAAACAGG AGGAtcgatgaattcgagctcg

Tab. 4. Použité primery pro konstrukci GFP značených kmenů.

Gen	Poloha	Délka (v bp)	Sekvence
<i>COX14</i>	1114	20	CATGAACGGTAAGAAGTACG
<i>ERG28</i>	1240	20	CTATGGGGCTATGTAAGTGA
<i>MCX1</i>	1981	20	GCTTGAGCAGGTTGAATTAG
<i>RSM26</i>	1423	20	CCGTGCTGAGAATGAAGTCT
<i>SKI8</i>	1868	20	CATTCTAGCTGGGTCATGAG
<i>TSC13</i>	1516	20	CGGTCTCATTTTCATTCGGTT

Tab. 5. Ověřovací primery.

### 3.1.4. Seznam použitých chemikálií a dalších látek

V tab. 6 a 7 jsou uvedeny veškeré chemikálie a látky použité pro tuto diplomovou práci.

Název	Zkratka	Výrobce
6 x DNA Loading Dye		
10 x LA PCR Pufr		Top - bio
Octan lithný	LiAc	Sigma - Aldrich
Agar		Dr. Kulich Pharma
Agaróza		Sigma - Aldrich
Bromokresolový purpur	BKP	Sigma - Aldrich
D – glukóza		Lach - Ner
PCR H <sub>2</sub> O		Top - Bio
Dimethyl sulfoxid	DMSO	Top - Bio
Salmonsperm	ssDNA	Boehringer Mannheim
Ethanol 96% (v/v)	EtOH	Penta, Lach - Ner
Ethidium bromid	EtBr	EDTA
Glycerol bezvodý		Lach - Ner
Hydroxid sodný	NaOH	Penta, Lach - Ner
Chlorid vápenatý	CaCl <sub>2</sub>	
Kvasničný autolyzát (šarže 41)		Imuna Pharm
Kys. chlorovodíková 35%	HCl	Penta
LA Taq DNA polymerases mix		Top - Bio
Octan lithný	LiAc	Sigma - Aldrich
Octan sodný	NaAc	Sigma - Aldrich
Pepton (pro bakteriologii)		Imuna Pharm
Polyethylenglykol	PEG	Sigma - Aldrich
PPP Master Mix		Top - Bio
Uracil	URA	
Geneticin	G418 (KanMX)	Sigma - Aldrich
Edicin		Sandoz

Tab. 6. Seznam použitých chemikálií pro přípravu médií a reakcí.

Název	Sumární vzorec	Výrobce
Phenylethanol	$C_8H_{10}O$	Sigma - Aldrich
Phenylethylacetát	$C_{10}H_{12}O_2$	Sigma - Aldrich
Phenylacetaldehyd	$C_8H_8O$	Sigma - Aldrich
Tyrosol	$C_8H_{10}O_2$	Sigma - Aldrich
Kyselina 2 – methylbutanová	$C_5H_{10}O$	Sigma - Aldrich
Kyselina octová	$C_2H_4O_2$	Sigma - Aldrich
Kyselina izomáselná	$C_4H_8O_2$	Sigma - Aldrich
Kyselina izovalerová	$C_5H_{10}O_2$	Sigma - Aldrich

Tab. 7. Seznam vybraných látek Ehrlichovy dráhy.

### 3.1.5. Seznam použitých laboratorních přístrojů

V tab. 8 je seznam přístrojů, které byly využívány pro experimenty této diplomové práce.

Název přístroje	Výrobce/označení
pH metr	Mettler Toledo
Vortex	Vortex genie 2
Míchadlo	IKA RH Basic 2
Laboratorní váha	Kern PCB
Analytická váha	Sartorius
Cyklér	Bioer XP cycler
Centrifuga	Labnet spectrafuge 24D, Boeco V – 32R
Zdroj k elektroforetické analýze	EC250 – 90
Termoblok	Torrey Pines
Horizontální třepačka	Labnet Problot 12S
Flowbox	ESCO
Epifluorescenční mikroskop	Leica DMR s lampou EBQ100
Makroskop	Progres CT3
Mikrotom	Leica VT1200S
Binolupa	Leica MZ16F
Spektrofotometr	WPA Biochrom S1200
Nanodrop	

Tab. 8. Seznam použitých laboratorních přístrojů.

### **3.1.6. Média ke kultivaci kvasinek**

#### **Pevná kultivační média**

##### **Glycerolové médium (GM)**

2% (w/v) agar

1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarže 41)

3% (v/v) glycerol bezvodý

1% (v/v) 1M CaCl<sub>2</sub>

1% (v/v) 5% roztok glukózy

1% (v/v) roztok uracilu (2 mg/ml)

1% (v/v) 96% ethanol

Při přípravě médií se používá destilovaná voda. Roztok kvasničného autolyzátu je při přípravě upraven na pH 5. Samostatně se připraví roztok obsahující agar, glycerol, vodu a zvlášť se připraví roztok glukózy. Po sterilizaci se roztoky smíchají v UV boxu a přidá se k nim ethanol, sterilní roztok uracilu, glukózy a CaCl<sub>2</sub>.

##### **Glycerolové médium (GM) + pH indikátor**

viz GM

0,01% (w/v) bromokresolový purpur (BKP)

BKP je pH indikátor, který je smíchán zvlášť s 96% ethanolem. Přidává se do smíchaných sterilizovaných roztoků pro přípravu GM. GM s BKP se využívá ke sledování alkalizace média kvasinkovými koloniemi.

##### **YEPG pevné**

1% (w/v) kvasničný autolyzát na YEPG

1% (w/v) pepton

2% (w/v) agar

2% (w/v) glukóza

Před sterilizací se připravuje samostatně roztok glukózy.

### **YEPG pevné s antibiotikem**

viz YEPG pevné + geneticin

0,04% (w/v) Geneticin (G418)

viz YEPG pevné + edicin

0,002% (w/v) Edicin

Antibiotikum geneticin se využívá při kultivaci transformovaných buněk. Využívá se jako selekční marker. Edicin působí proti kontaminaci bakteriemi.

### **Tekutá kultivační média**

#### **YEPG tekuté**

1% (w/v) kvasničný autolyzát

1% (w/v) pepton

2% (w/v) glukóza

Před sterilizací se připravuje samostatně roztok glukózy.

#### **Skladovací médium**

60% (v/v) glycerol

10% (w/v) glukóza

2% (w/v) pepton

1% (w/v) kvasničný autolyzát na YEPG

Před sterilizací se připravuje samostatně roztok glukózy.

### **3.1.7. Počítačové programy a internetové databáze**

#### ***Internetové databáze***

Saccharomyces Genome Database (SGD)

<http://www.yeastgenome.org>

Pubmed Medline

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Yeast metabolome database

<http://www.ymdb.ca>

### ***Programy pro analýzu obrazu***

NIS Elements

PhotoFiltre 7

### ***Programy pro navrhování primerů***

Oligo Calculator

<http://mcb.berkeley.edu/labs/krantz/tools/oligocalc.html>

Reverse Complement

[http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)

## **3.2. Metody**

### **3.2.1. Sterilizace**

Namíchaná média, roztoky, párátko, mikrozkušavky a špičky k mikropipetám byly sterilovány v autoklávu 20 min při teplotě 120°C a tlaku 120kPa. Laboratorní sklo bylo sterilováno suchým teplem 3,5 h při teplotě 180°C. Plastové centrifugační zkumavky byly sterilovány minimálně 24 h parami kyseliny peroctové v hermeticky uzavřeném plastovém obalu.

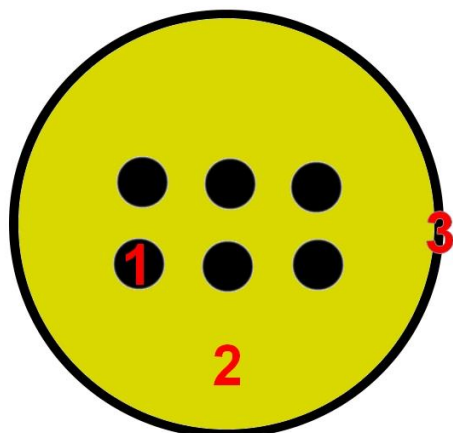
### **3.2.2. Skladování kvasinkových kmenů**

Kvasinkové kmeny byly skladovány v konzervách obsahujících skladovací médium při teplotě -80°C.

### **3.2.3. Kultivace kvasinkových kmenů**

Ze skladovací konzervy se pomocí sterilního párátko přenesla suspenze buněk na pevné médium s edicinem. Buňky na pevném médiu byly kultivovány přes noc v termostatu s teplotou 28°C. Kvasinkové kultury se dále kultivovaly na pevných médiích v termostatu při teplotě 28°C (např. v podobě obřích kolonií), nebo v tekutých médiích za aerobních podmínek v Ehrlenmayerových baňkách na horizontální třepačce při teplotě 28°C.

Obří kolonie byly zaočkovány nakapáním 10  $\mu$ l suspenze buněk (o koncentraci 12 mg mokré váhy biomasy/ml sterilní vody) na plotny obsahující pevné GM do šestic (viz Obr. 16).



Obr. 16. Schéma tvorby šestic.  
 1) 10  $\mu$ l kapička suspenze biomasy (12mg/1ml)  
 2) GM s pH indikátorem BKP  
 3) Petriho miska

### 3.2.4. Příprava kvasinkových kmenů

#### 3.2.4.1. Příprava PCR kazety s fluorescenčním značením GFP

Na přípravu kazety byla použita metoda PCR - reakce s LA DNA Polymerases Mix v celkovém objemu 50  $\mu$ l jedné reakční směsi. Jako templát byl použit plazmid pKT127. PCR probíhala v Bioer XP cycleru. Konkrétní složky reakční směsi jsou znázorněny v tab. 9 a parametry PCR jsou znázorněny v tab. 10. Po skončení PCR reakce se úspěšnost výroby PCR kazety ověřovala pomocí elektroforetické analýzy. Pokud reakce proběhla v pořádku, byly kazety použity pro transformaci kvasinkových buněk.

Reakční směs	Objem ( $\mu$ l)
PCR H <sub>2</sub> O	37
PCR dNTPs mix (10mM)	2,5
DMSO	1
10 x LA PCR pufr	5
LA Taq DNA polymerases mix (2.5 U)	0,5
Templátová DNA 10 ng. $\mu$ l <sup>-1</sup>	1
150 $\mu$ M 5' primer	1,5
150 $\mu$ M 3' primer	1,5

Tab. 9. Složky reakční směsi pro výrobu PCR kazet pomocí reakce s LA DNA Polymerases Mix.



Krok	Průběh	Teplota (°C)	Čas	
1	Počáteční denaturace	94	1 min	
2	Denaturace	94	45 s	35 cyklů
3	Připojení primerů	60	45 s	
4	Elongace	68	3 kb/2 min	
5	Závěrečná elongace	68	5 min	
6	Chlazení	4		

Tab. 10. Parametry metody PCR pro reakci LA DNA Polymerases Mix.

### 3.2.4.2. Elektroforetická analýza

Elektroforetická analýza je metoda, pomocí které je možné ověřit, zda se úspěšně amplifikovala DNA metodou PCR. Pro ověřovací elektroforézu je potřeba vyrobit agarosový gel. Pro jeho výrobu byl použit 1% roztok agarosy v 0,5x TBE. Roztok se nechal vařit v mikrovlnné troubě, dokud se agarosa v TBE zcela nerozpustila. Var je třeba sledovat, protože rozpouštění netrvá dlouho a je nutné zabránit vybublání roztoku. Rozpuštěný roztok se poté lehce ochladil, přidalo se 25  $\mu$ l 1000x koncentrovaného ethidium bromidu a roztok se nalil do vaničky na elektroforézu. Do vaničky se dále umístil hřeben, který vytvoří při zatuhnutí jamky na vzorky. Po zatuhnutí se z vaničky opatrně vyjmul hřeben a do jamek byly napipetovány vzorky z PCR. Poté se vanička umístila do elektroforetické aparatury a zalila 0,5x TBE, tak aby byl gel ponořený. Aparatura se zavřela a byla připojena ke zdroji jednosměrného proudu s nastavením na dobu 40 minut s napětím 80 V. Po uběhnutí této doby se gel přenesl pod UV transiluminátor, kde se mohla potvrdit úspěšnost či neúspěšnost tvorby PCR kazet.

### 3.2.4.3. Transformace kvasinek

K transformaci byla použita metoda LiAc/SS-DNA/PEG (Gietz, Schiestl et al. 1995). Jako rodič byl vybrán kvasinkový kmen BY4742. Nejprve bylo potřeba přenést buněčnou suspenzi do 20 ml tekutého YEPG média. Kultura byla přes noc inkubována na horizontální třepačce při 28°C. Další den byla kultura naředěna do 50 ml tekutého YEPG média na výslednou koncentraci  $5 \times 10^6$  buněk/ml (optická denzita = 0,5). Kultura byla kultivována za

aerobních podmínek 2 generační doby (3 – 5 h) na horizontální třepače při 28°C. Po dosažení koncentrace buněk  $2 \times 10^7$  buněk/ml byl celý objem kultury zcentrifugován (5 min, 22°C, 4500 otáček) a pelet promyt ve 25 ml sterilní destilované vody. Po centrifugaci při stejném nastavení byl pelet resuspendován v 1 ml sterilní destilované vody a přenesen do 1,5 ml mikrokumavky. Resuspendovaný pelet byl opět zcentrifugován (1 min, 22°C, 6000 otáček), supernatant odstraněn a k peletě byla přidána destilovaná voda, tak aby výsledná hustota suspenze byla  $2 \times 10^9$  buněk/ml. Celý objem mikrokumavky se rozpipetoval po 100 µl do nových mikrokumavek, buňky z jednotlivých alikvotů byly získány centrifugací (2 min, 22°C, 6000 otáček) a po odstranění supernatantu byla k takto připraveným a promytým buňkám přidána transformační směs (viz níže).

#### Transformační směs

240 µl 50% PEG

36 µl 1M LiAc

10 µl povařené ssDNA

40 µl sterilní destilované H<sub>2</sub>O

34 µl připravené templátové DNA pro transformaci

Do mikrokumavky s buňkami se nejprve přidá PEG a LiAc a řádně se vše promíchá. Dále se přidá ssDNA, sterilní H<sub>2</sub>O a připravená DNA. Celá směs se znovu promíchá.

Výsledná směs byla řádně promíchána a inkubována na 40 min v termobloku při 42 °C. Buňky byly sklizeny centrifugací (1 min, 22°C, 6000 otáček) a získaný pelet byl resuspendován v 1 ml tekutého YEPG média. Buňky se nechaly inkubovat na horizontální třepače při 28°C na 2 - 3 hod. Poté byly vysety na selekční médium s antibiotikem. Vyseté buňky se nechaly inkubovat v termostatu při 28°C. Růst potenciálních transformovaných buněk je viditelný přibližně po 3 - 4 dnech kultivace.

#### **3.2.4.4. Ověření transformovaných kmenů pomocí metody PCR**

Úspěšnost integrace transformační kazety do genomu je možné ověřit pomocí metody PCR (Colony PCR). Pro ověření se připravila specifická PCR směs o celkovém objemu 10 µl na jeden vzorek (viz Tab. 11). Program pro PCR je v tabulce 12. Před samotnou reakcí je třeba získat templátovou DNA z biomasy transformovaných buněk. Pro její získání byla využita denaturace pomocí 15 µl 0,2 M NaOH. Hydroxid se smíchal s malým množstvím

biomasy (odebrána biomasa velikosti špendlíkové hlavičky pomocí pipety). Denaturace probíhala 15 minut při 95°C v termocykléru. Zbytky buněk byly odstraněny centrifugací. V supernatantu uvolněná DNA slouží jako templátová DNA potřebná do reakce.

Reakční směs PPP mix 1 kb/min	Objem (μl)
PCR H <sub>2</sub> O	3
PPP Master Mix (Top-Bio)	5
Templátová DNA	1
3' ověřovací primer 5pmol.μl <sup>-1</sup>	0,5
5' ověřovací primer 5pmol.μl <sup>-1</sup>	0,5

Tab. 11. Složky směsi pro ověřovací PCR.

Krok	Průběh	Teplota (°C)	Čas	
1	Počáteční denaturace	94	1 min	35 cyklů
2	Denaturace	94	15 s	
3	Připojení primerů	52	15 s	
4	Elongace	72	1 kb/min	
5	Závěrečná elongace	72	5 min	
6	Chlazení	4		

Tab. 12. Program ověřovací PCR.

Produkty ověřovací PCR se podrobily elektroforetické analýze v agarosovém gelu (viz kapitola 3.2.4.2.)

### 3.2.5. Další použité metody

#### 3.2.5.1. Mikroskopické metody

Pro pozorování vytvořených GFP kmenů a testů chování buněk v roztoku daných látek Ehrlichovy dráhy (viz kapitola 3.1.5.) bylo potřeba vyrobit preparáty pro mikroskopii. Preparáty se pozorovaly pod epifluorescenčním mikroskopem. Morfologie a vitalita buněk se dokumentovala pomocí nastavení Nomarski ve viditelném světle. Pro sledování proteinů fúzovaných s GFP se používalo nastavení pro fluorescenční mikroskopii (použité filtry: excitační – modrá, emisní – zelená, pro analýzu U a L buněk bylo použito zvětšení 1000x, pro

řezy byly využity také menší zvětšení). Pozorování se zdokumentovalo pomocí vestavěné kamery.

### **3.2.5.2. Výroba mikroskopických řezů kolonií**

Výroba mikroskopických řezů kolonií se prováděla na mikrotomu. Z nakapané šestice na plotně byla vyříznuta krajní kolonie, která byla přesunuta do malé vaničky. Kolonie byla zalita 2 ml 3% agarózového gelu. Po ztuhnutí byla kolonie žiletkou rozpůlena a jedna půlka byla připevněna na držák mikrotomu. Mikrotomem připravené řezy měly tloušťku 20  $\mu\text{m}$ .

### **3.2.5.3. Koncentrační testy látek**

Koncentrační testy látek byly využity pro stanovení ideálních koncentrací působících látek na určité množství kvasinkových buněk (viz kapitola 5.1). Po stanovení ideálních koncentrací se zjištěné koncentrace využívaly pro testy na vyrobených kvasinkových kmenech.

K zjištění ideální koncentrace látek byly prováděny testy na kontrolním kmeni BY4742. Pro test bylo potřeba získat U a L buňky v koncentraci 70 mg mokré váhy biomasy/ml sterilní vody. Látky se testovaly v různých koncentracích: koncentrace použité pro jednotlivé látky jsou uvedeny v experimentální části, a proto byla vždy připravena ředící řada. Celkový objem roztoku byl 1 ml, z něhož 100  $\mu\text{l}$  připadlo připravené suspenzi buněk (o výše zmíněné koncentraci 70 mg/ml), která se do roztoku přidávala jako poslední. Namíchané roztoky s biomasou se daly inkubovat do termoboxu.

Testy vlivu vybraných látek na nově zkonstruovaných kmenech (viz kapitola 5.5.) byly provedeny s již vtipovanou koncentrací dané látky z prvních testů na kmeni BY4742. Pro testy a mikroskopii jsme použili koncentraci 20 mg mokré váhy biomasy/ml sterilní vody (koncentrace 70 mg/ml se zdála být příliš koncentrovaná) U a L buněk. Připravené vzorky včetně kontroly byly inkubovány 1,5 hodiny na horizontální třepače. Po inkubaci byly vzorky mikroskopovány pod kontrastem Nomarski a pomocí fluorescenční mikroskopie při zvětšení 1000x.

### 3.2.5.4. Sekvenace DNA

Pro sekvenaci DNA byla nejprve provedena izolace DNA ze studovaných transformovaných kmenů pomocí alkalické lyze v 15  $\mu\text{l}$  0,2 M NaOH (viz kapitola 3.2.4.4.). Izolovaná DNA byla přidána jako templát do PCR směsi, která je popsána v tab. 14. Pro reakci byl použit PCR program pro denaturaci viz Tab. 12.

Reakční směs PPP mix 1 kb/min	Objem ( $\mu\text{l}$ )
PCR H <sub>2</sub> O	21
PPP Master Mix (Top-Bio)	25
Templátová DNA	1
3' ověřovací primer 5pmol. $\mu\text{l}^{-1}$	1,5
5' ověřovací primer 5pmol. $\mu\text{l}^{-1}$	1,5

Tab. 14. PCR směs k přípravě sekvenace DNA (program viz Tabulka 12).

Po PCR reakci byla provedena elektroforetická analýza (viz kapitola 3.2.4.2.) pro potvrzení správně připraveného konstruktů pro sekvenování. Následně byla DNA přečištěna. Nejprve se nechala srazit ethanolem (96%, 2,5 x objem směsi) a 3 M NaAc (0,1 x objem směsi). Srážení probíhalo 15 min při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sražená DNA byla získána centrifugací 30 min při  $4^{\circ}\text{C}$  na maximální otáčky. K peletě DNA bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  80% ethanolu. Směs byla centrifugována za stejných podmínek. Po centrifugaci se slil supernatant a peleta byla vysušena. Usušená peleta byla resuspendována v 50  $\mu\text{l}$  destilované vody. Koncentrace DNA byla stanovena pomocí měření na nanodropu. Pro měření byly nanášeny vždy 2  $\mu\text{l}$  roztoku při nastavení 230 nm.

#### Příprava směsi k sekvenaci

Celkový objem: 8  $\mu\text{l}$

0,5  $\mu\text{l}$  ověřovací primer (přímý nebo zpětný 5pmol. $\mu\text{l}^{-1}$ )

DNA v koncentraci 5 – 10 ng/100pb

H<sub>2</sub>O přidaná do celkového objemu 8  $\mu\text{l}$

Namíchané vzorky byly zaslány k sekvenaci. Získaná sekvence byla porovnávána s předpokládanou sekvencí.

## 4. Cíle práce

- Přiblížit pomocí dostupné literatury diferenciaci kolonií kvasinek *S. cerevisiae* na U a L typy buněk, vysvětlit Ehrlichovu dráhu u kvasinek.
- Zjistit ideální koncentraci vybraných látek Ehrlichovy dráhy a porovnat odolnost U a L buněk vůči látkám.
- Zkonstruovat 6 nových kmenů *S. cerevisiae* produkujících vybrané proteiny fúzované s GFP.
- Ověřit expresi genů a lokalizaci označených GFP proteinů na diferencovaných U a L buňkách *S. cerevisiae*.
- Ověřit vliv vybraných látek Ehrlichovy dráhy na expresi genů a lokalizaci označených GFP proteinů na diferencovaných U a L buňkách *S. cerevisiae*.

## 5. Výsledky

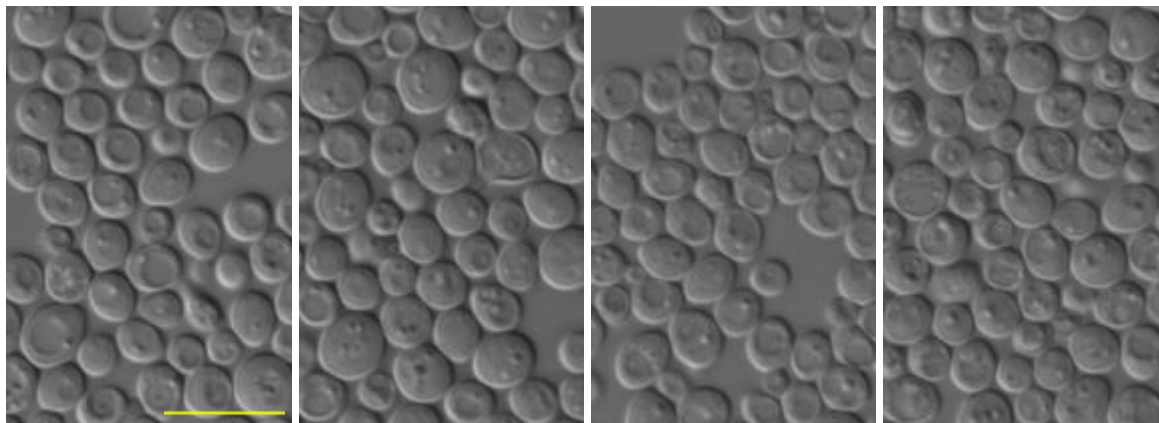
### 5.1. Stanovení koncentračních limitů vybraných látek

Pomocí dvoudimenzionální komprehenzivní plynové chromatografie - MS (GC x GC - MS) byly identifikovány látky, které jsou schopny produkovat buňky kvasinek v koloniích (Ing. Eva Ježková ve spolupráci s Ing. Anna Jirošovou, Ph. D., seznam látek viz kapitola 3.1.4.) a které by případně mohly fungovat jako signální molekuly nebo jinak ovlivňovat morfologii a metabolismus buněk v jednotlivých subpopulacích tvořících kolonii *S. cerevisiae*. Pro experimenty byly vybrány metabolity, které jsou součástí Ehrlichovy dráhy u kvasinek (viz kapitola 2.6.4.), a to konkrétně alkoholy: phenylethanol, kyseliny: kyselina 2 – methylbutanová, kyselina octová, kyselina izomáselná, kyselina izovalerová další látky (estery kyselin, deriváty alkoholů a další): tyrosol, phenylethylacetát, phenylacetaldehyd. Pro další pokusy na kvasinkách bylo potřeba stanovit koncentrace těchto látek, aby bylo možné sledovat, jaký mají tyto látky vliv na morfologii a vitalitu dvou hlavních buněčných subpopulací v kolonii tedy U a L buněk. Pro výběr testovaných koncentrací jsme vyšli z koncentrace 0,5%, která byla použita pro studium vlivu isoamylalkoholu na kvasinku *S. cerevisiae* v tekutých kulturách (Dickinson 1996). U každé látky jsme testovali ještě další dvě koncentrace, jak je uvedeno níže. Vliv všech testovaných látek byl sledován paralelně na U a L buňkách, které byly odebrány z 12 – 14 dní starých plně diferencovaných kolonií kmene BY4742 rostoucích na GM médiu. Oba typy buněk byly resuspendovány ve vodě na koncentraci 70 mg mokré váhy buněčné biomasy/ml a s přidavkem různých koncentrací látek byly kultivovány 1, 2 a 5 dní v termoboxu. Inkubace ve vodě zabraňovala další diferenciaci buněk. Morfologie buněk po působení jednotlivých látek byla monitorována mikroskopicky s použitím kontrastu Nomarski a byla porovnávána s morfologií buněk, které nebyly vystaveny působení žádné z látek (buňky byly inkubovány pouze v destilované vodě).

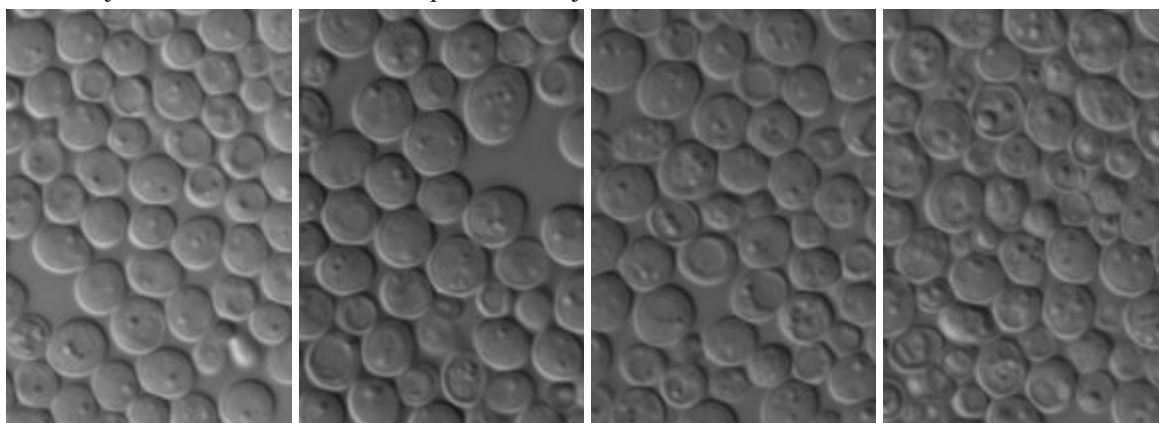
### 5.1.1. Phenylethanol v BY4742

Pro studium vlivu phenylethanolu jsme vybrali koncentrace 0,6; 6 a 60 mM.

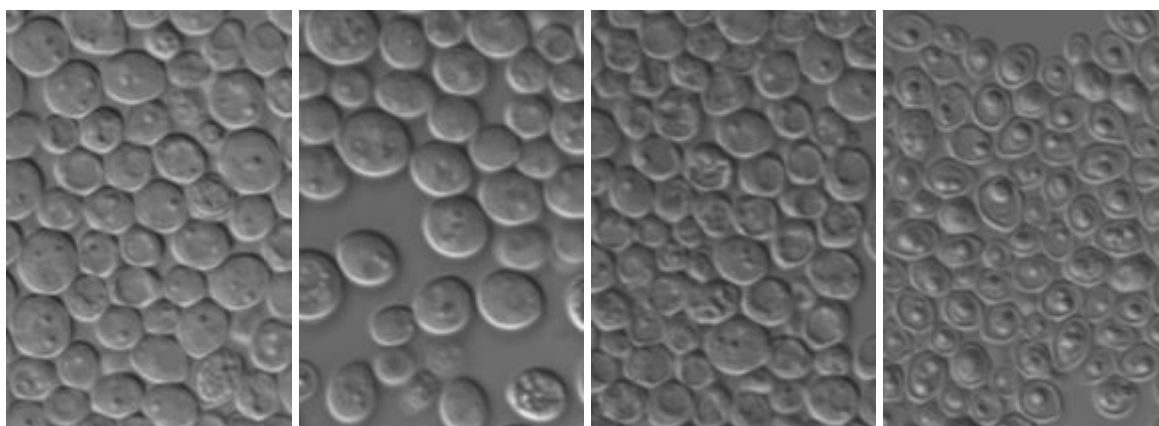
U buňky KO	0,6 mM	6 mM	60 mM
------------	--------	------	-------



Obr. 17. Phenylethanol - 1 den působení látky na U buňky kmene BY4742. Měřítka odpovídá 10  $\mu$ m. Zvětšení je u všech obrázků buněk v kapitole 5.1. stejné.



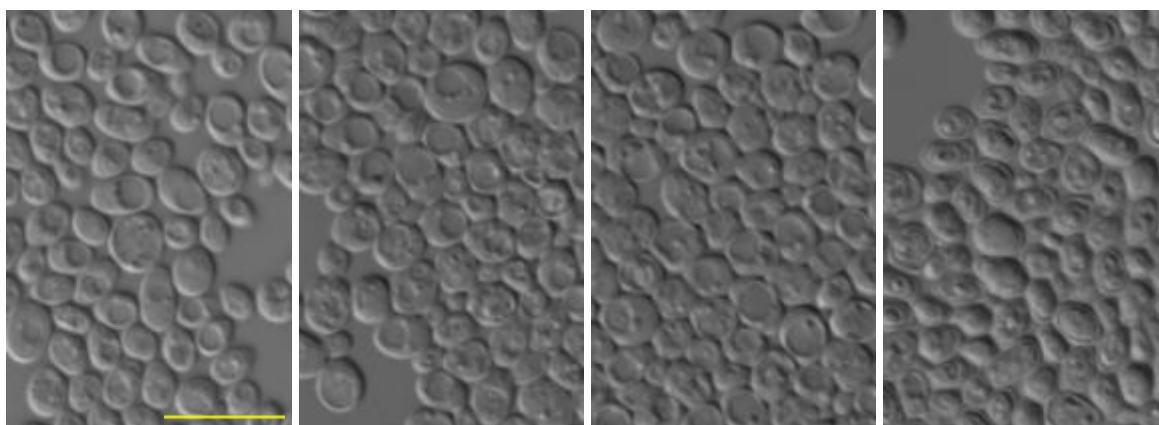
Obr. 18. Phenylethanol - 2 dny působení látky na U buňky kmene BY4742



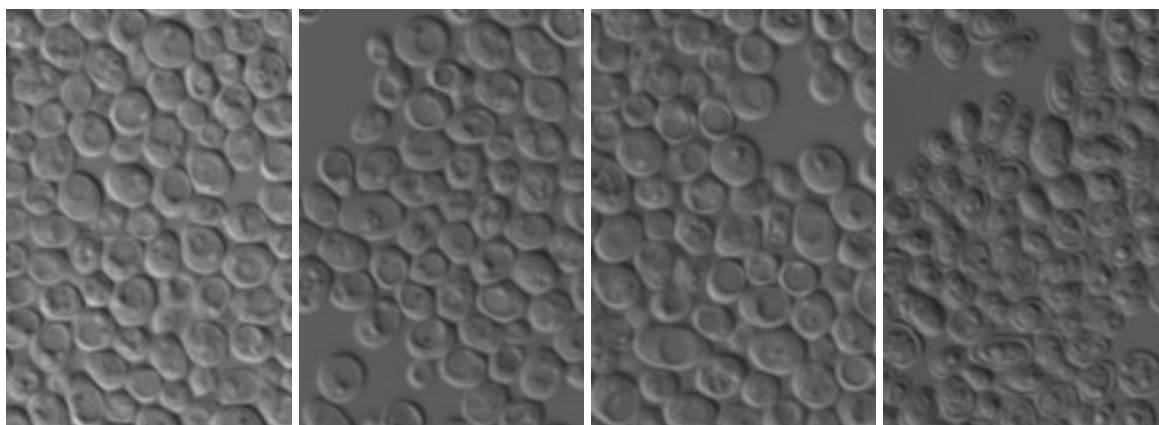
Obr. 19. Phenylethanol - 5 dní působení látky na U buňky kmene BY4742



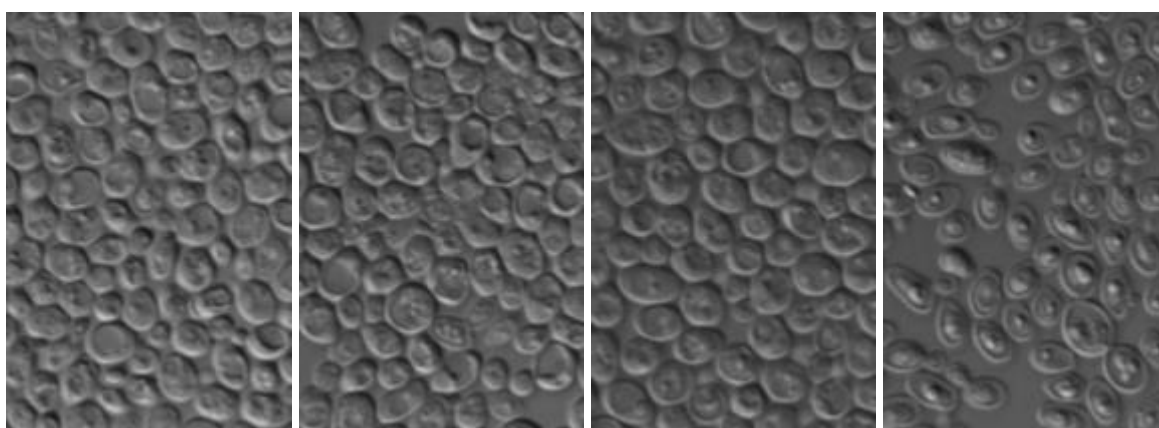
L buňky KO	0,6 mM	6 mM	60 mM
------------	--------	------	-------



Obr. 20. Phenylethanol - 1 den působení látky na L buňky kmene BY4742



Obr. 21. Phenylethanol - 2 dny působení látky na L buňky kmene BY4742



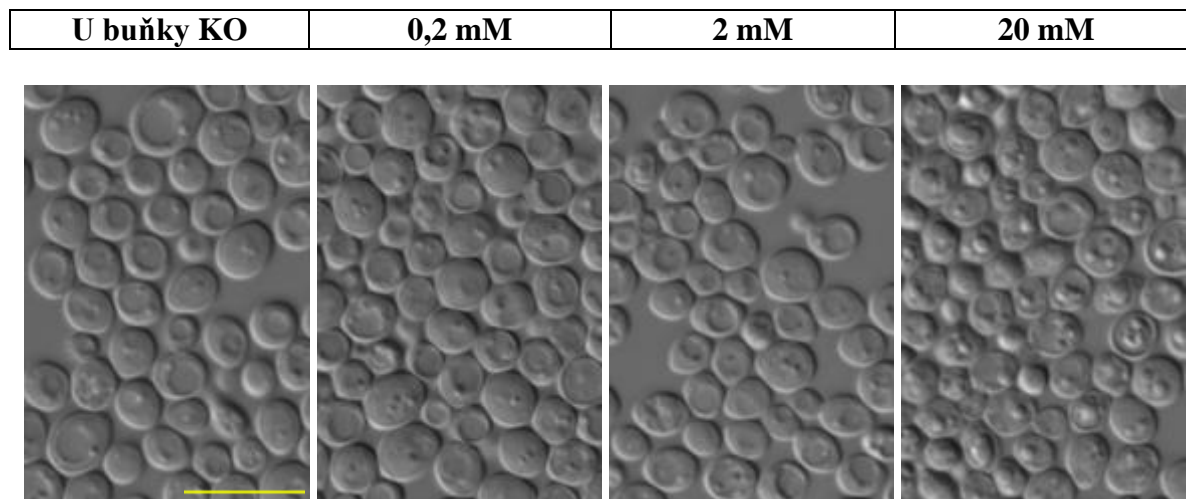
Obr. 22. Phenylethanol - 5 dní působení látky na L buňky kmene BY4742

Vliv phenylethanolu na morfologii buněk byl patrný u U buněk až po dvoudenním působení hlavně u 60 mM koncentrace. Po 5 dnech působení jsou téměř všechny buňky mrtvé. Přidání 0,6 mM phenylethanolu nevyvolalo viditelnou změnu morfologie těchto buněk. 6 mM koncentrace vyvolá viditelné změny morfologie až po 5 dnech působení.

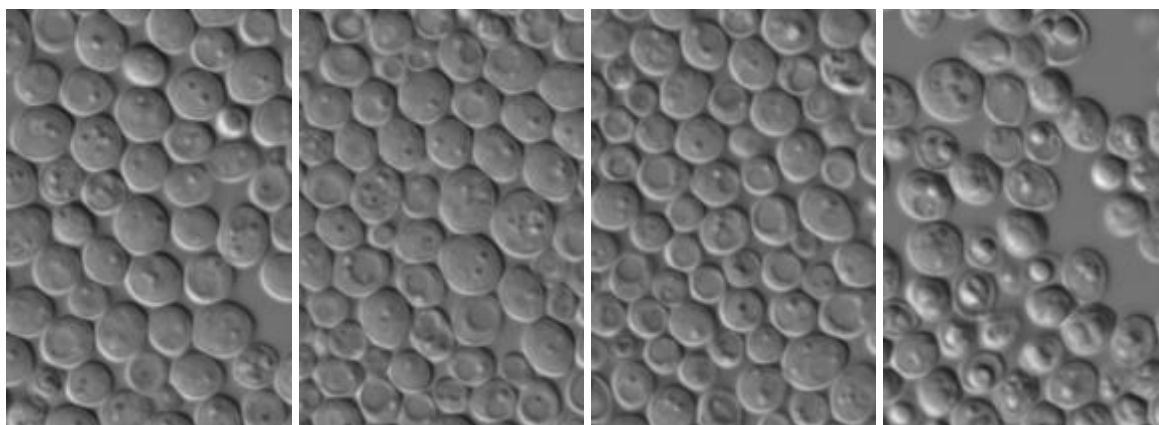
L buňky reagují na působení phenylethanolu daleko rychleji; už po jednom dni působení 60 mM koncentrace této látky jsou viditelné výrazné změny jejich morfologie.

### 5.1.2. Phenylethylacetát v BY4742

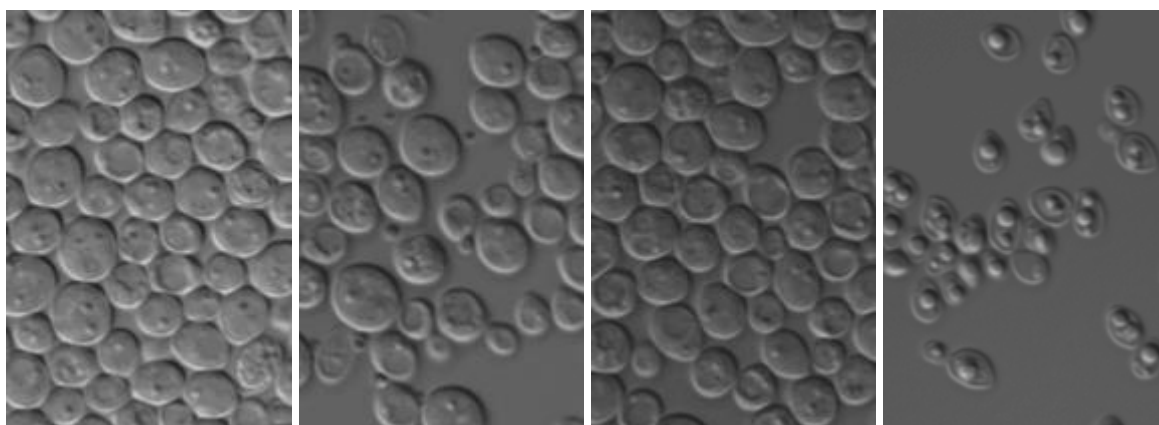
Pro studium vlivu phenylethylacetátu jsme vybrali koncentrace 0,2; 2 a 20 mM.



Obr. 23. Phenylethylacetát - 1 den působení látky na U buňky kmene BY4742

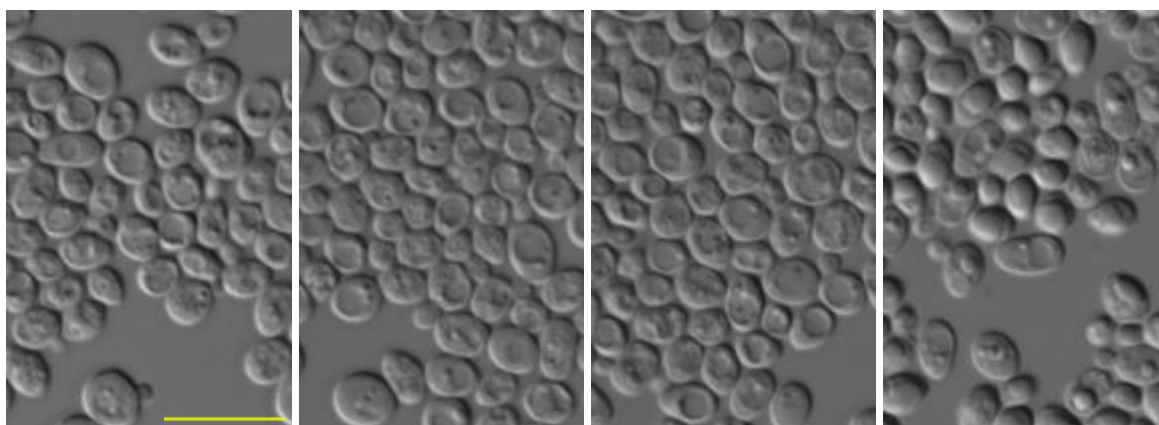


Obr. 24. Phenylethylacetát - 2 dny působení látky na U buňky kmene BY4742

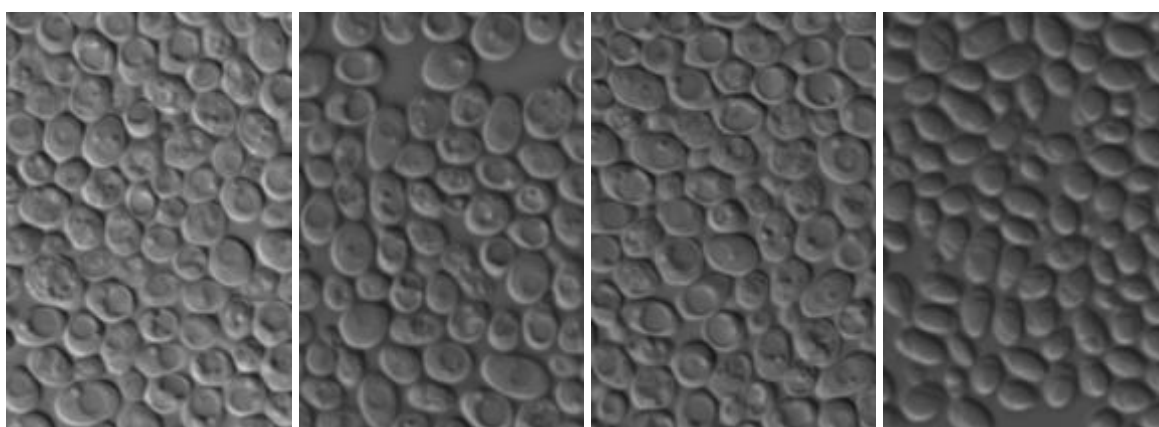


Obr. 25. Phenylethylacetát - 5 dní působení látky na U buňky kmene BY4742

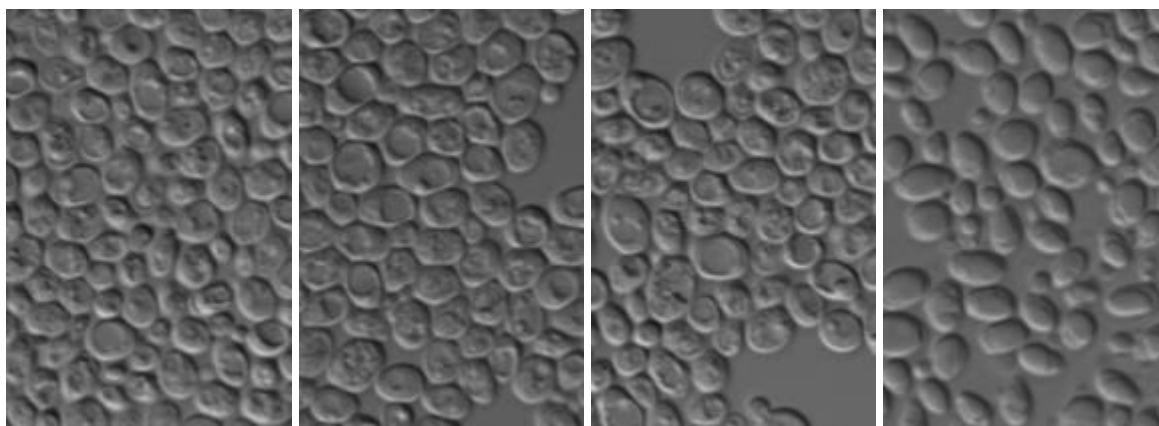
L buňky KO	0,2 mM	2 mM	20 mM
------------	--------	------	-------



Obr. 26. Phenylethylacetát - 1 den působení látky na L buňky kmene BY4742



Obr. 27. Phenylethylacetát - 2 dny působení látky na L buňky kmene BY4742



Obr. 28. Phenylethylacetát - 5 dní působení látky na L buňky kmene BY4742

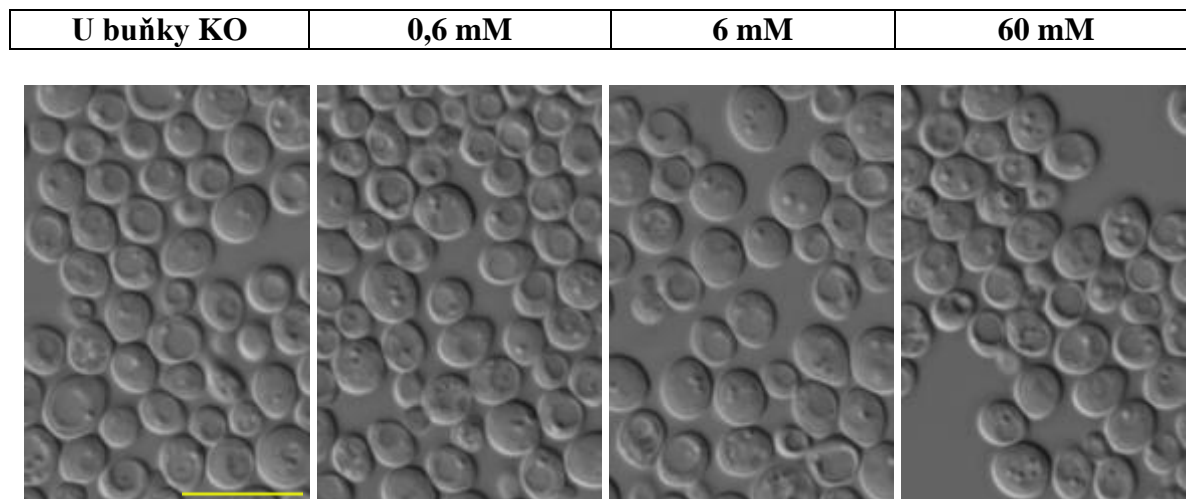
Vliv nejvyšší koncentrace (20 mM) phenylethylacetátu na morfologii buněk byl viditelný u U buněk již po 1 dni působení. Buňky jsou po této době téměř z 85 % mrtvé. U střední a nejnižší koncentrace látky je změna morfologie velmi málo viditelná.

L buňky jsou již po prvním dni působení 20 mM phenylethylacetátu mrtvé. Při koncentraci 0,2 a 2 mM není změna morfologie patrná podobně jako u U buněk. Menší změny

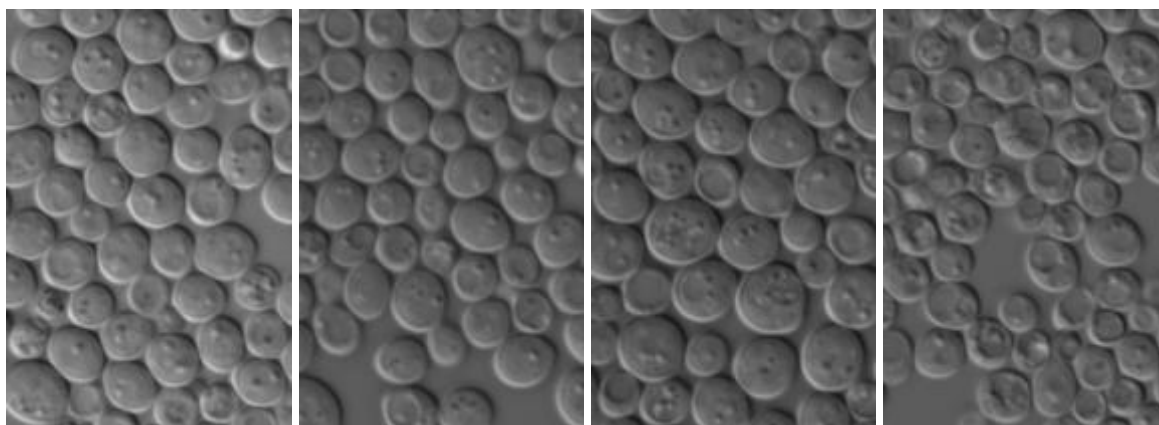
morfologie u nižších testovaných koncentrací můžeme pozorovat až po 5 dnech působení na U i L buňky.

### 5.1.3. Phenylacetaldehyd v BY4742

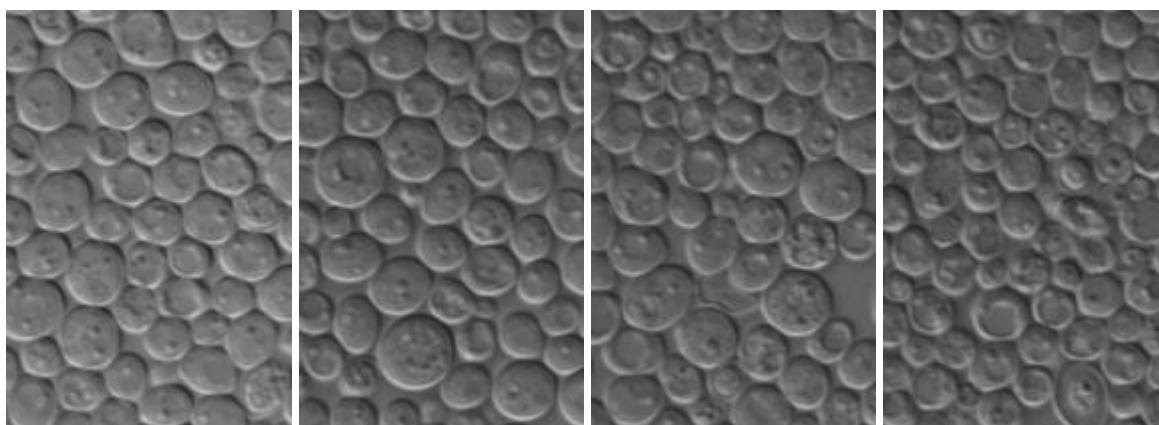
Pro studium vlivu phenylacetaldehydu jsme vybrali koncentrace 0,6; 6 a 60 mM.



Obr. 29. Phenylacetaldehyd - 1 den působení látky na U buňky kmene BY4742

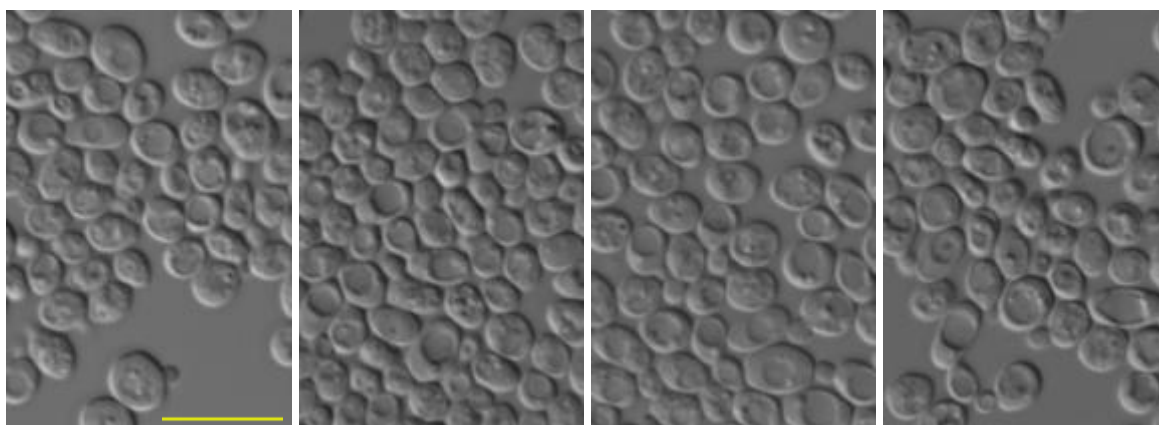


Obr. 30. Phenylacetaldehyd – 2 dny působení látky na U buňky kmene BY4742

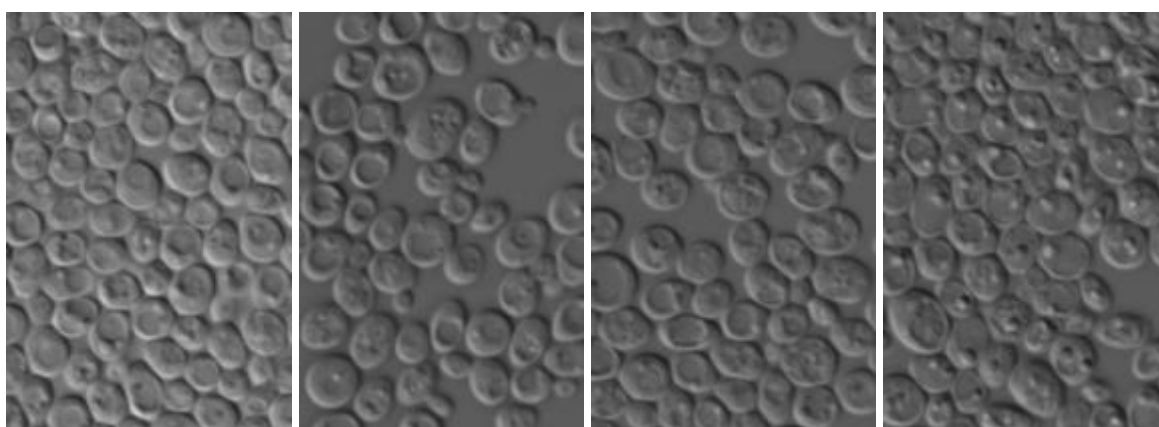


Obr. 31. Phenylacetaldehyd – 5 dní působení látky na U buňky kmene BY4742

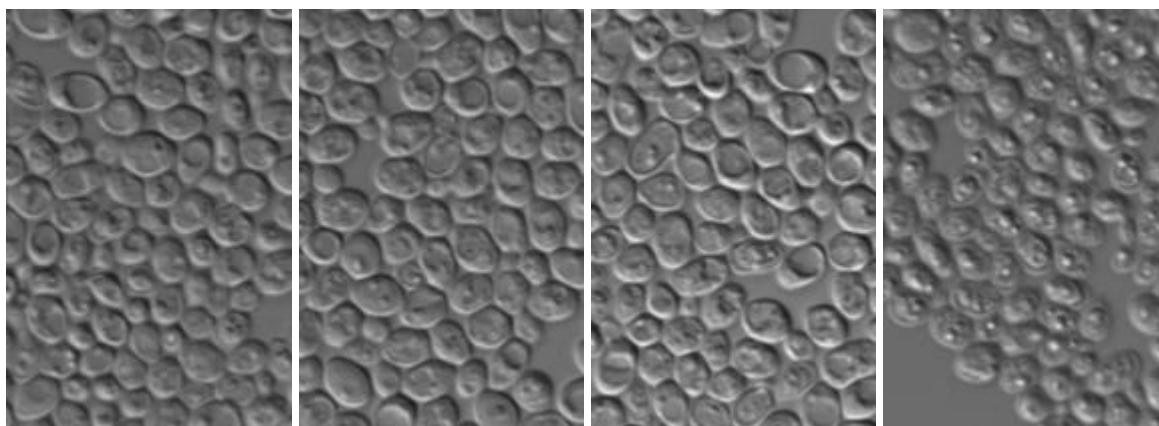
L buňky KO	0,6 mM	6 mM	60 mM
------------	--------	------	-------



Obr. 32. Phenylacetaldehyd – 1 den působení látky na L buňky kmene BY4742



Obr. 33. Phenylacetaldehyd – 2 dny působení látky na L buňky kmene BY4742



Obr. 34. Phenylacetaldehyd – 5 dní působení látky na L buňky kmene BY4742

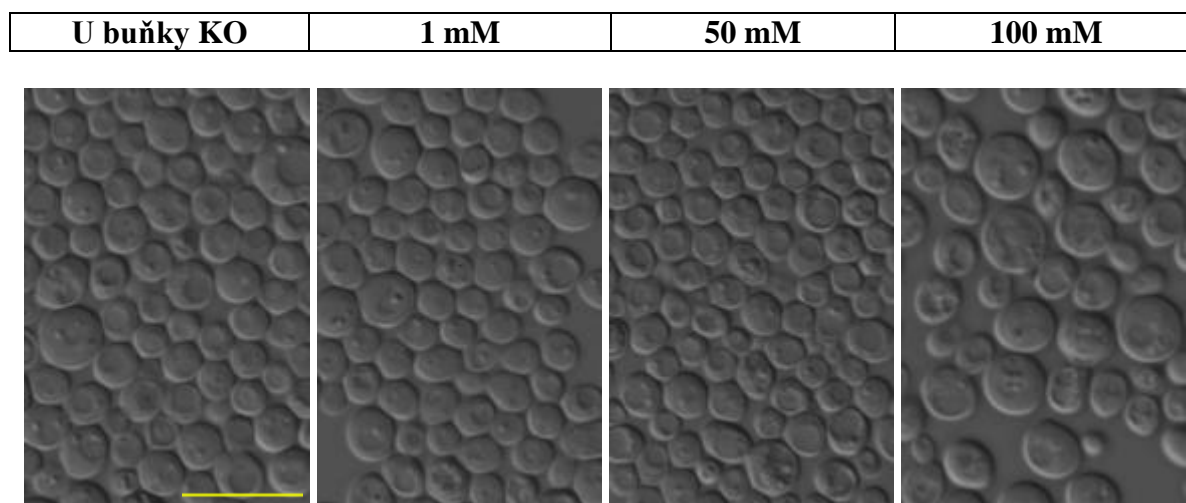
Působení phenylacetaldehydu na morfologii buněk bylo celkově slabší. Při 60 mM koncentraci látky byl vliv na morfologii U buněk slabý, ale viditelný již po 1 dni působení. Po 2 dnech působení je viditelná změna morfologie u většího počtu buněk. Na rozdíl od působení nejvyšší koncentrace phenylethylacetátu po působení phenylacetaldehydu U buňky zcela

neodumírají. Změny morfologie u nižších koncentrací látky jsou u U buněk nepatrné a částečně viditelné až po 5 dnech působení u 6 mM koncentrace.

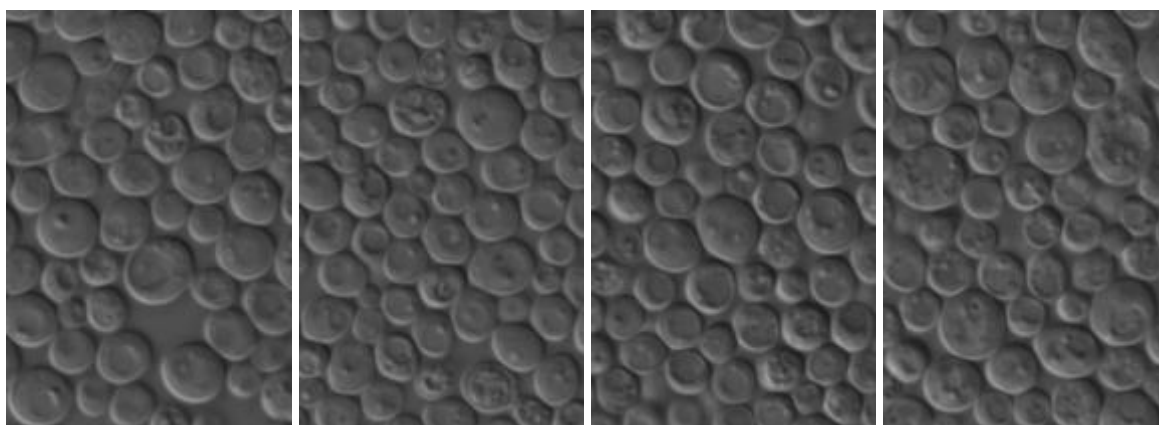
L buňky vykazují životaschopnost po 1 dni působení 60 mM phenylacetaldehydu. Zcela mrtvé jsou až po 5 dnech působení. Změny morfologie L buněk při nižších koncentracích látky jsou méně nápadné. Viditelné jsou až po 5 dnech působení u 6 mM koncentrace phenylacetaldehydu.

#### 5.1.4. Tyrosol v BY4742

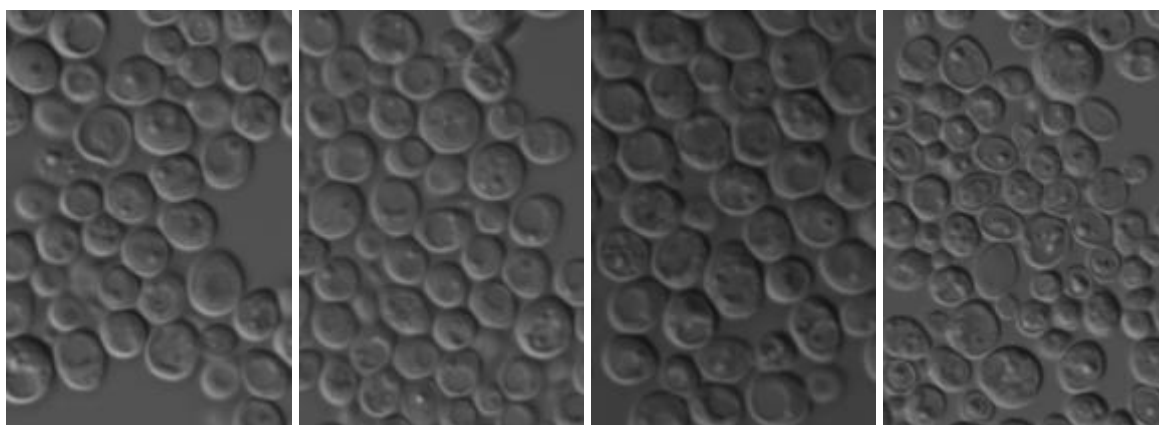
Pro studium vlivu tyrosolu jsme vybrali koncentrace 1, 50 a 100 mM.



Obr. 35. Tyrosol - 1 den působení látky na U buňky kmene BY4742

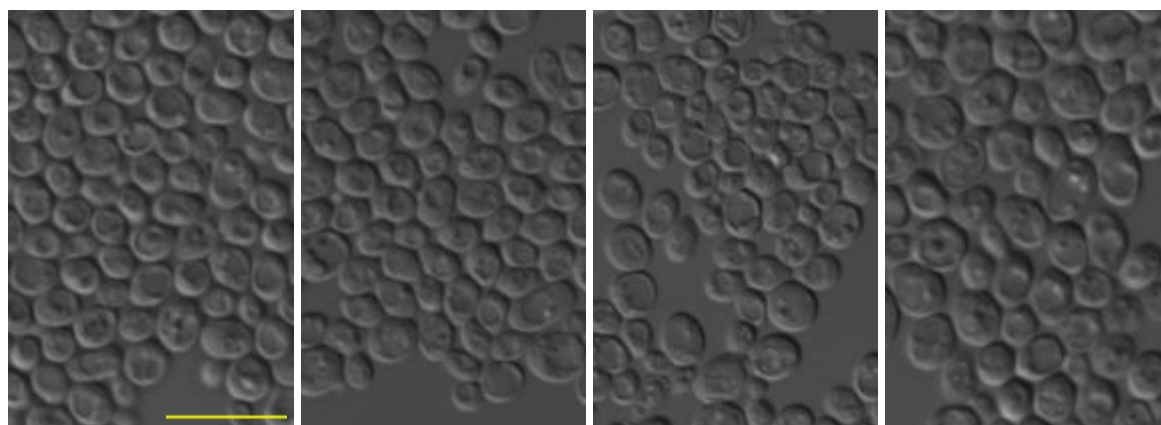


Obr. 36. Tyrosol - 2 dny působení látky na U buňky kmene BY4742

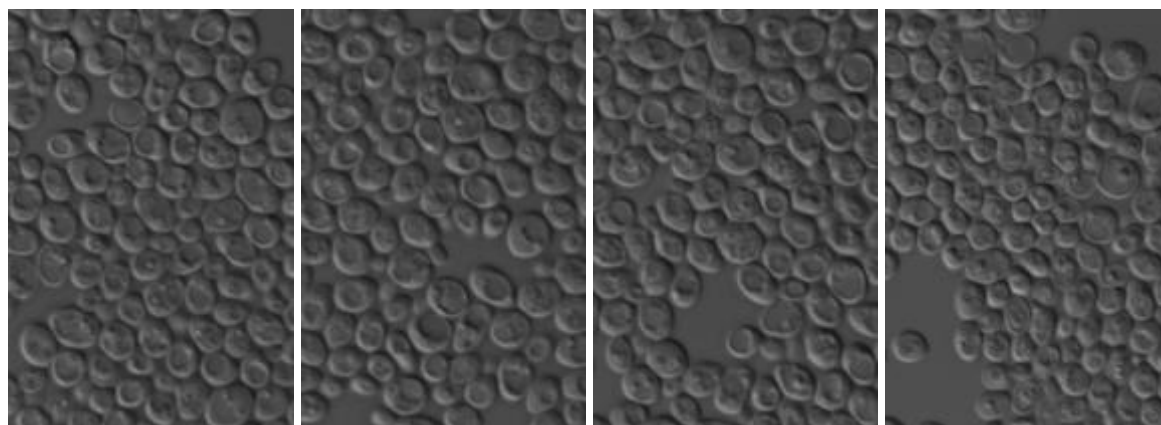


Obr. 37. Tyrosol - 4 dny působení látky na U buňky kmene BY4742

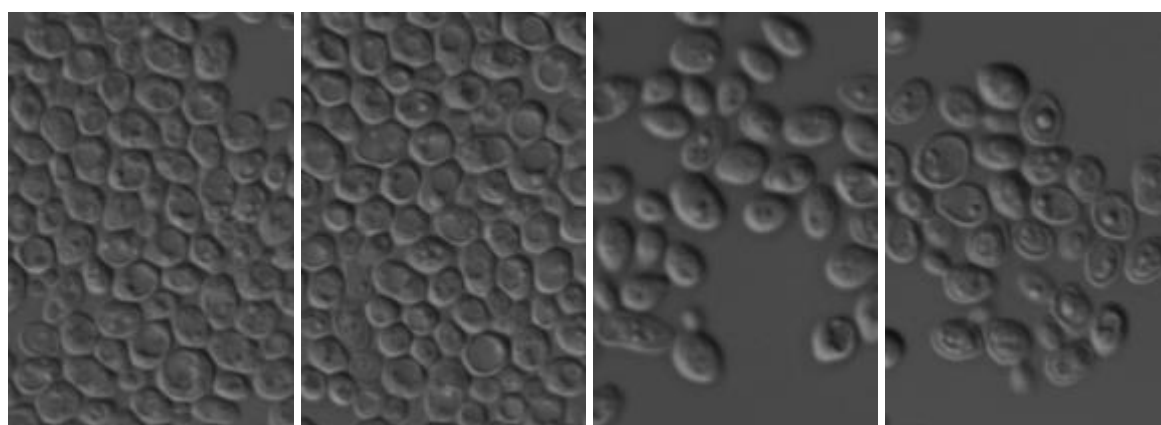
L buňky KO	1 mM	50 mM	100 mM
------------	------	-------	--------



Obr. 38. Tyrosol - 1 den působení látky na L buňky kmene BY4742



Obr. 39. Tyrosol - 2 dny působení látky na L buňky kmene BY4742



Obr. 40. Tyrosol - 4 dny působení látky na L buňky kmene BY4742

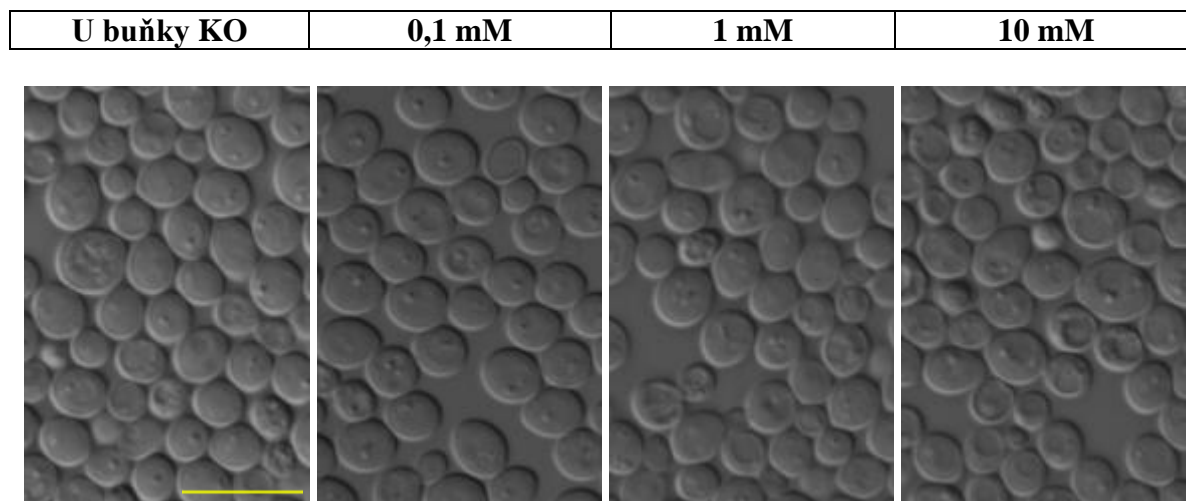
Vliv tyrosolu na morfologii U buněk byl dobře viditelný po 2 dnech působení 100 mM koncentrace této látky. Po 4 dnech působení 100 mM tyrosolu jsou U buňky zcela mrtvé. Viditelná změna morfologie U buněk je patrná i u 50 mM koncentrace látky po 4 dnech působení. Nejnižší koncentrace nemá na morfologii téměř žádný průkazný vliv.



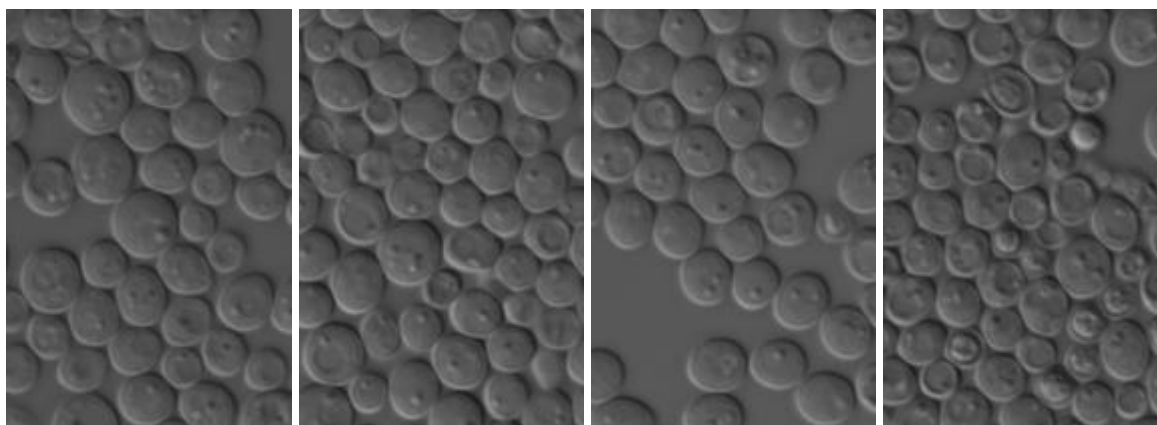
Vliv tyrosolu na L buňky je částečně viditelný již po prvním dni působení 50 mM a lépe 100 mM koncentrace. Po 4 dnech působení jsou buňky při těchto koncentracích tyrosolu mrtvé. Při koncentraci 1 mM jsou změny zcela nepatrné.

### 5.1.5. Kyselina 2 - methylbutanová v BY4742

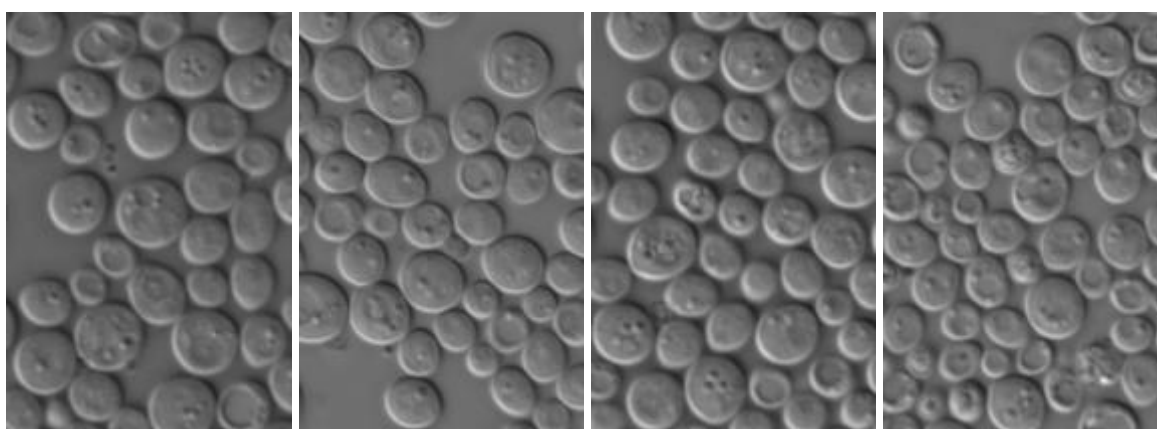
Pro studium vlivu kyseliny 2 - methylbutanové jsme vybrali koncentrace 0,1; 1 a 10 mM.



Obr. 41. Kyselina 2 - methylbutanová - 1 den působení látky na U buňky kmene BY4742

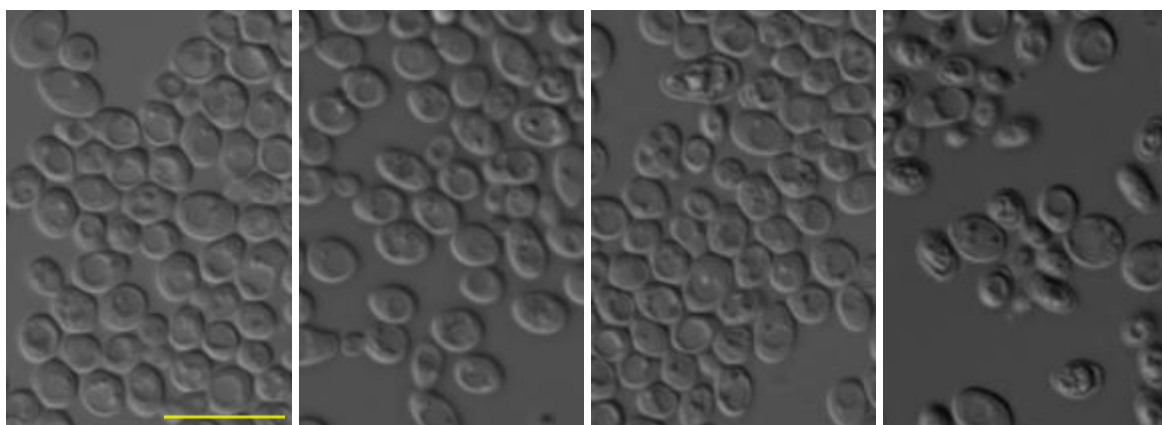


Obr. 42. Kyselina 2 - methylbutanová - 3 dny působení látky na U buňky kmene BY4742

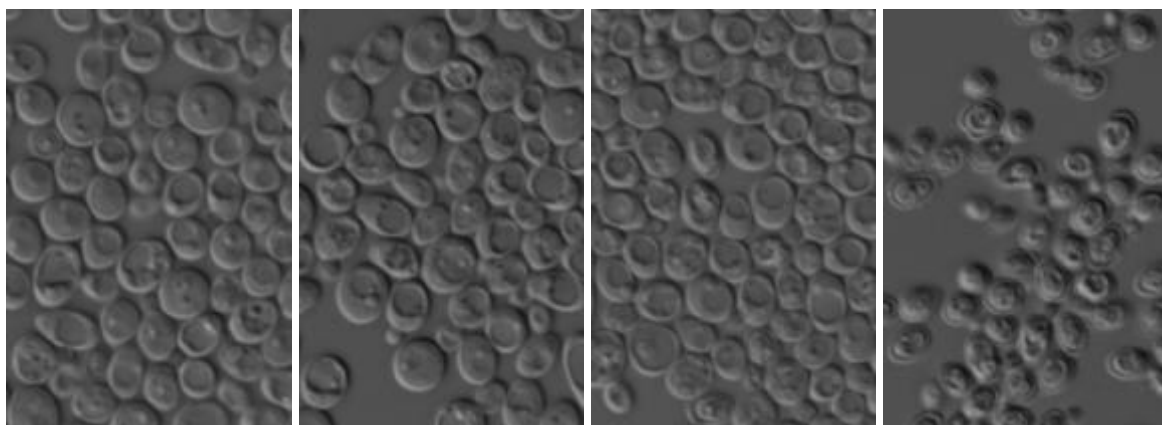


Obr. 43. Kyselina 2 - methylbutanová - 4 dny působení látky na U buňky kmene BY4742

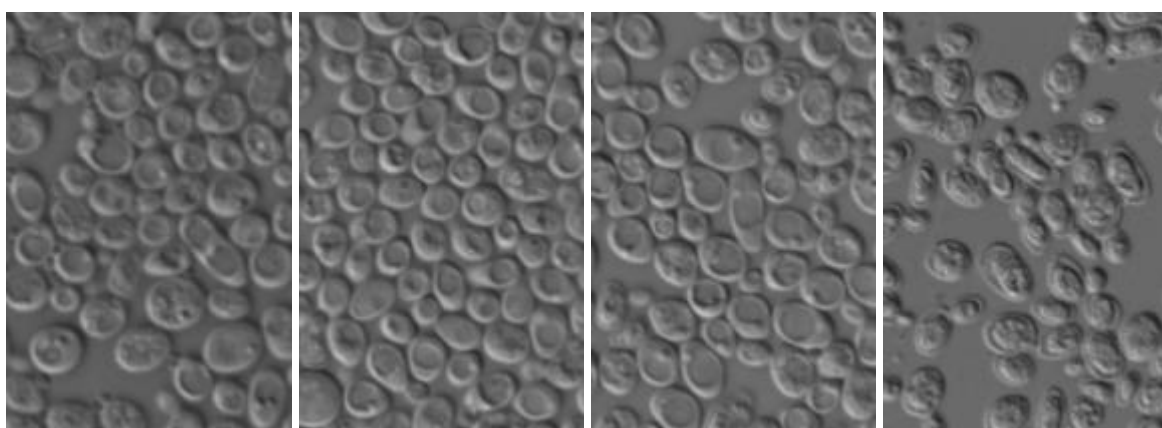
L buňky KO	0,1 mM	1 mM	10 mM
------------	--------	------	-------



Obr. 44. Kyselina 2 - methylbutanová - 1 den působení látky na L buňky kmene BY4742



Obr. 45. Kyselina 2 - methylbutanová - 3 dny působení látky na L buňky kmene BY4742



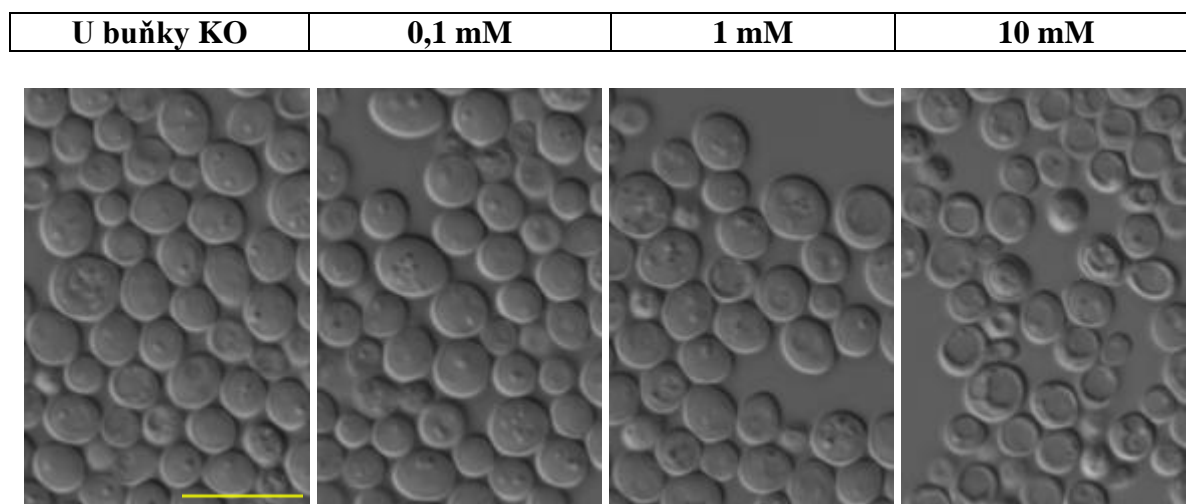
Obr. 46. Kyselina 2 - methylbutanová - 4 dny působení látky na L buňky kmene BY4742

Vliv kyseliny 2 – methylbutanové na U buňky byl prokazatelný až po 3 dnech působení 10 mM koncentrace látky. Při nižších koncentracích 0,1 mM a 1 mM se příliš morfologie nezměnila ani po 4 dnech působení. Destruktivní účinek této kyseliny na U buňky byl obecně nižší i po 4 dnech působení, kdy i při 10 mM koncentraci se ve vzorku objevují životaschopné buňky.

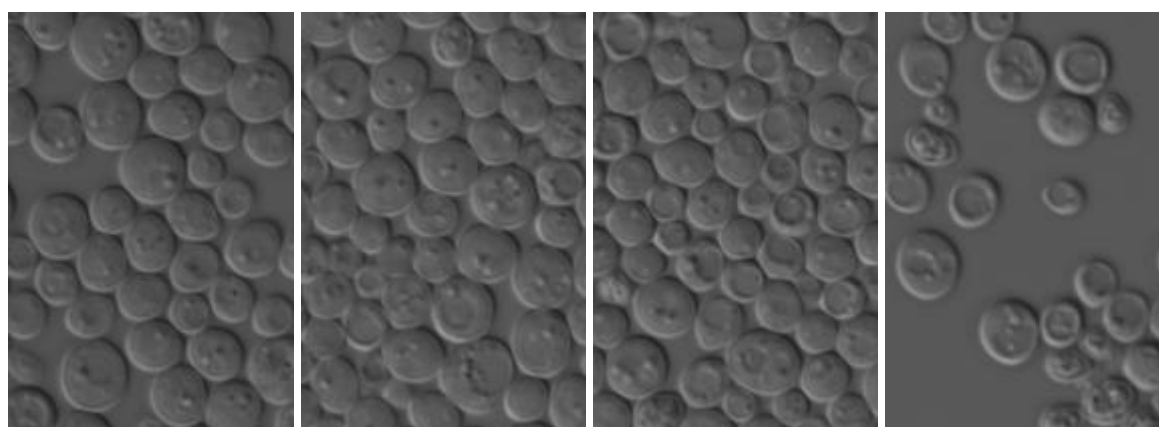
Vliv na změnu morfologie L buněk byl viditelný již po prvním dni působení 10 mM kyseliny 2 – methylbutanové, kdy byly buňky mrtvé. Nižší koncentrace látky měly celkově méně prokazatelný vliv na změnu morfologie buněk. Po 3 a 4 dnech působení jsou znatelné menší změny morfologie při 1 mM koncentraci.

### 5.1.6. Kyselina octová v BY4742

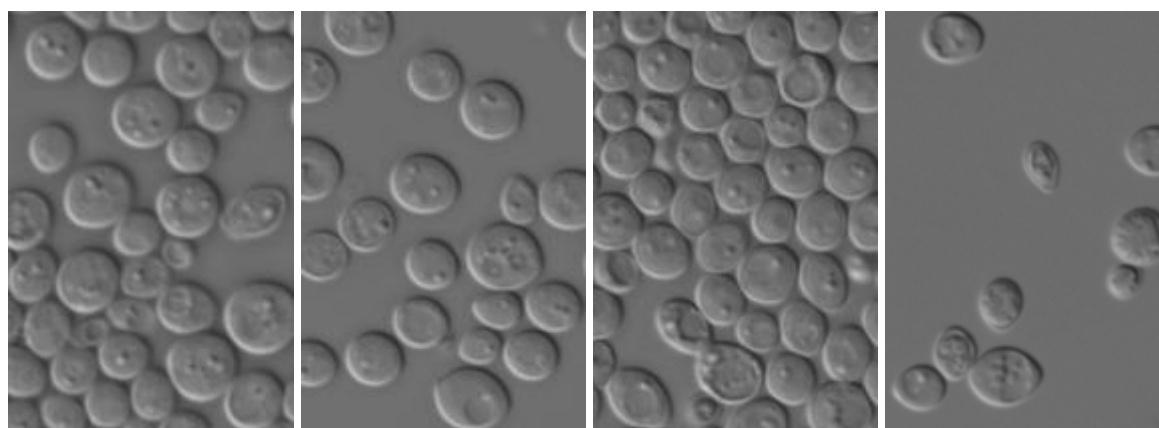
Pro studium vlivu kyseliny octové jsme vybrali koncentrace 0,1; 1 a 10 mM.



Obr. 47. Kyselina octová - 1 den působení látky na U buňky kmene BY4742

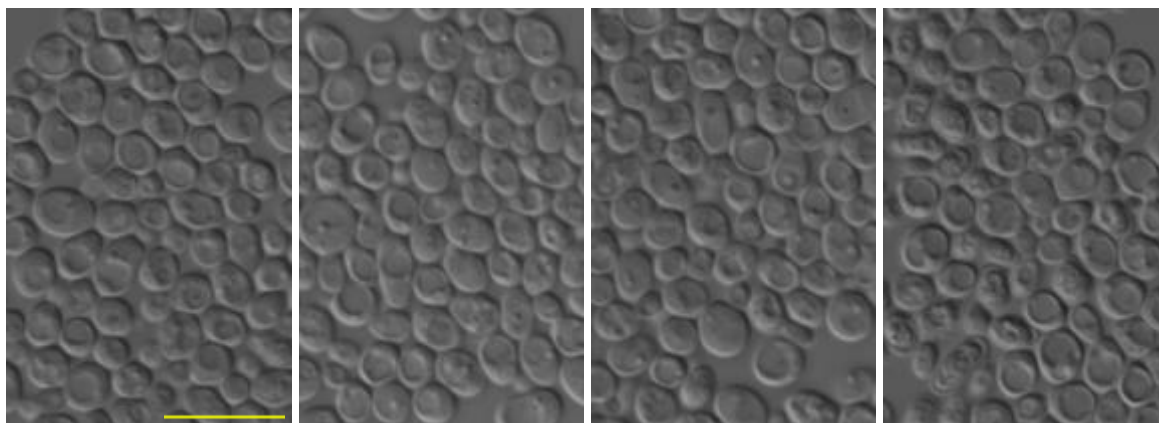


Obr. 48. Kyselina octová - 3 dny působení látky na U buňky kmene BY4742

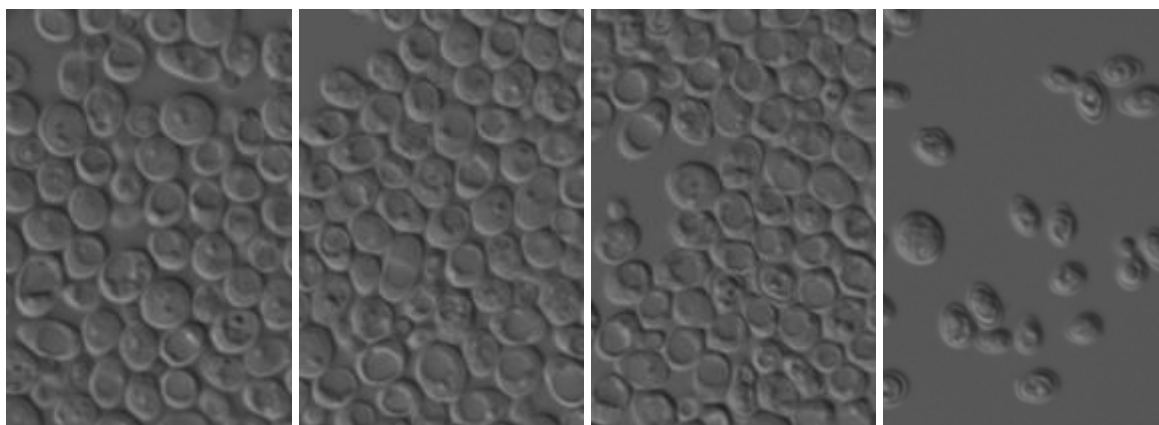


Obr. 49. Kyselina octová - 4 dny působení látky na U buňky kmene BY4742

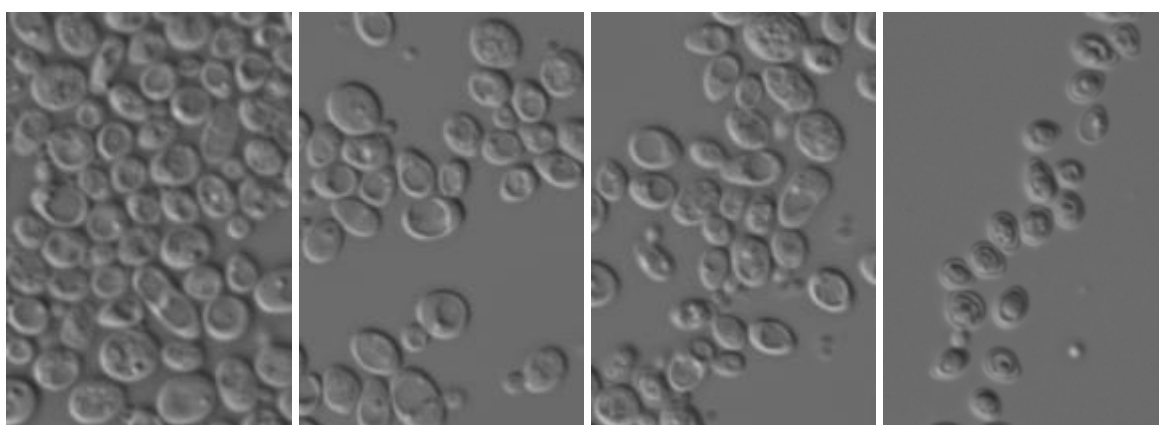
L buňky KO	0,1 mM	1 mM	10 mM
------------	--------	------	-------



Obr. 50. Kyselina octová - 1 den působení látky na L buňky kmene BY4742



Obr. 51. Kyselina octová - 3 dny působení látky na L buňky kmene BY4742



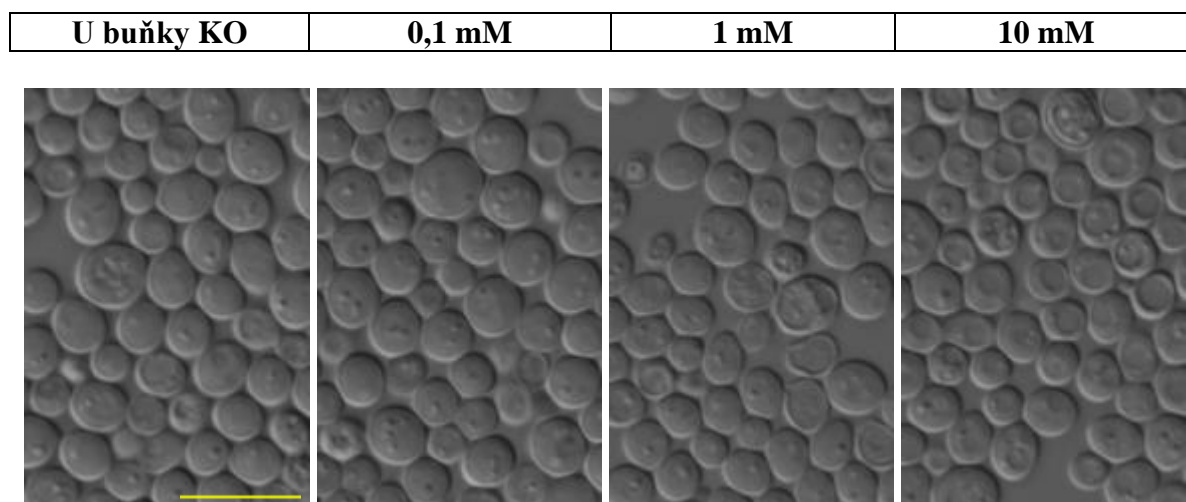
Obr. 52. Kyselina octová - 4 dny působení látky na L buňky kmene BY4742

Vliv kyseliny octové na změnu morfologie buněk byl celkově velmi rychlý. Při 10 mM se objevila změna morfologie U buněk již při po prvním testovacím dni. Po dalších dnech působení se buňky postupně jeví jako mrtvé. U koncentrací 0,1 mM a 1 mM je změna morfologie U buněk velmi málo průkazná po celý průběh testování.

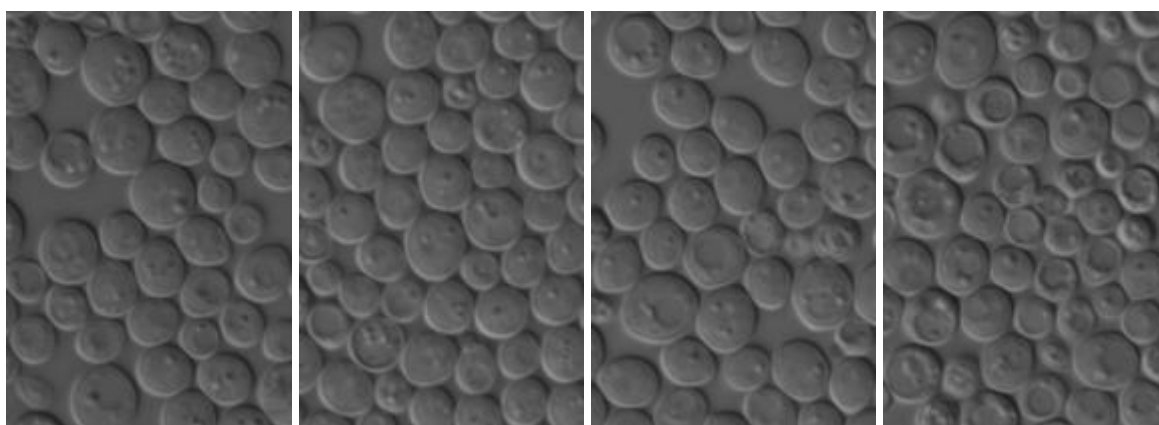
Působení kyseliny octové na L buňky byl výrazný také již po prvním dni testování, kdy se objevila výrazná změna morfologie buněk. Po 3 dnech působení jsou vidět menší změny i u 0,1 mM a 1 mM koncentrace látky. Po 4 dnech působení je viditelná výrazná destrukce buněk.

### 5.1.7. Kyselina izomáselná v BY4742

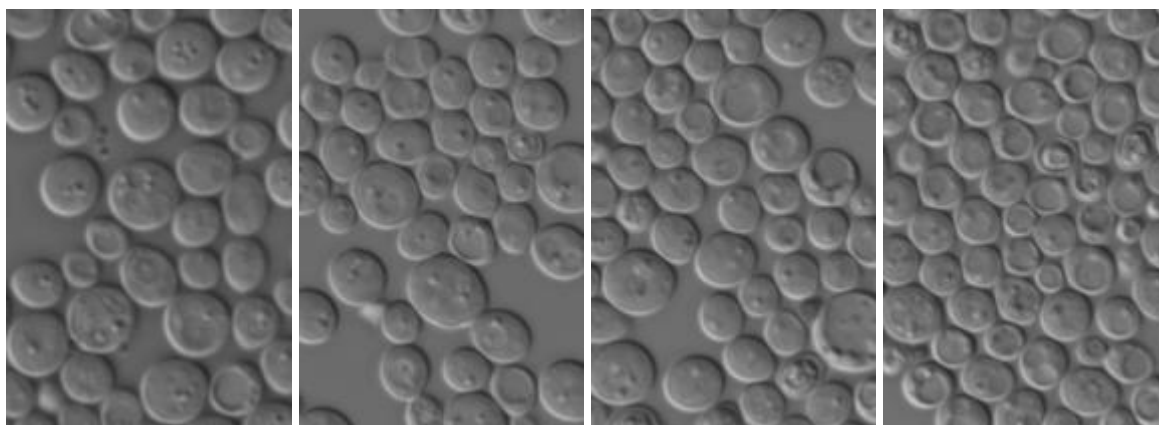
Pro studium vlivu kyseliny izomáselné jsme vybrali koncentrace 0,1; 1 a 10 mM.



Obr. 53. Kyselina izomáselná - 1 den působení látky na U buňky kmene BY4742



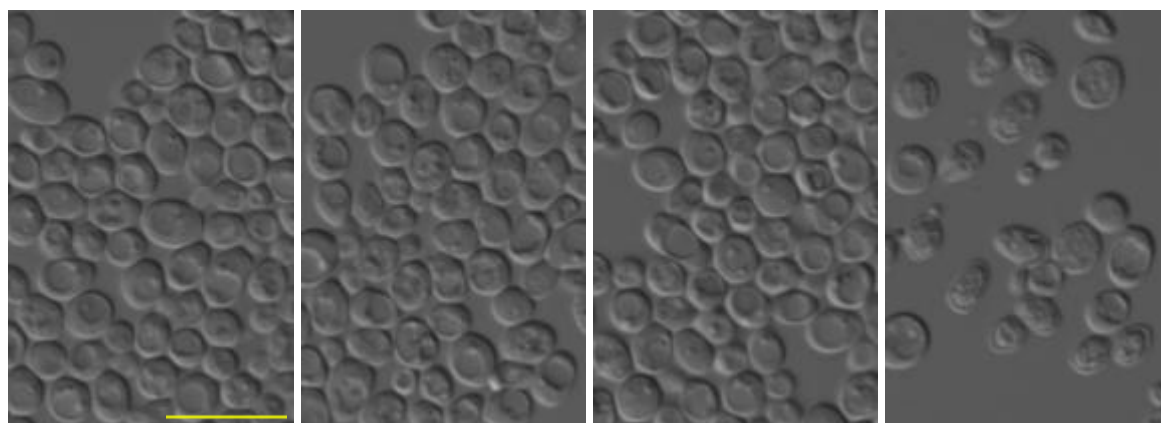
Obr. 54. Kyselina izomáselná - 3 dny působení látky na U buňky kmene BY4742



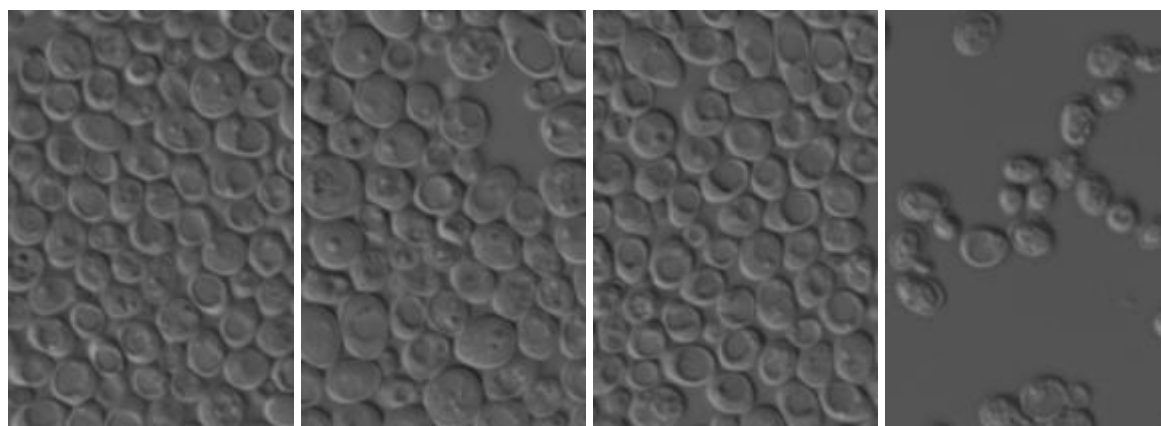
Obr. 55. Kyselina izomáselná - 4 dny působení látky na U buňky kmene BY4742



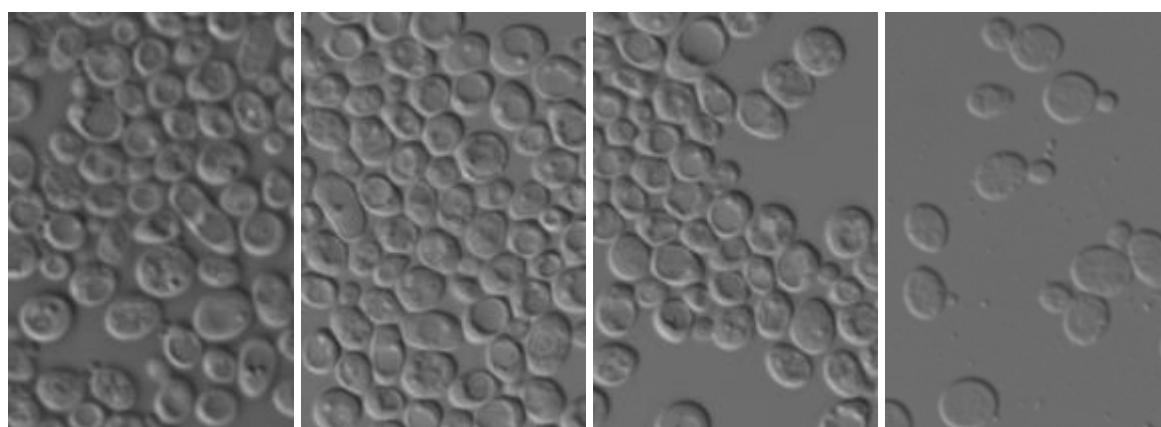
L buňky KO	0,1 mM	1 mM	10 mM
------------	--------	------	-------



Obr. 56. Kyselina izomáselná - 1 den působení látky na L buňky kmene BY4742



Obr. 57. Kyselina izomáselná - 3 dny působení látky na L buňky kmene BY4742



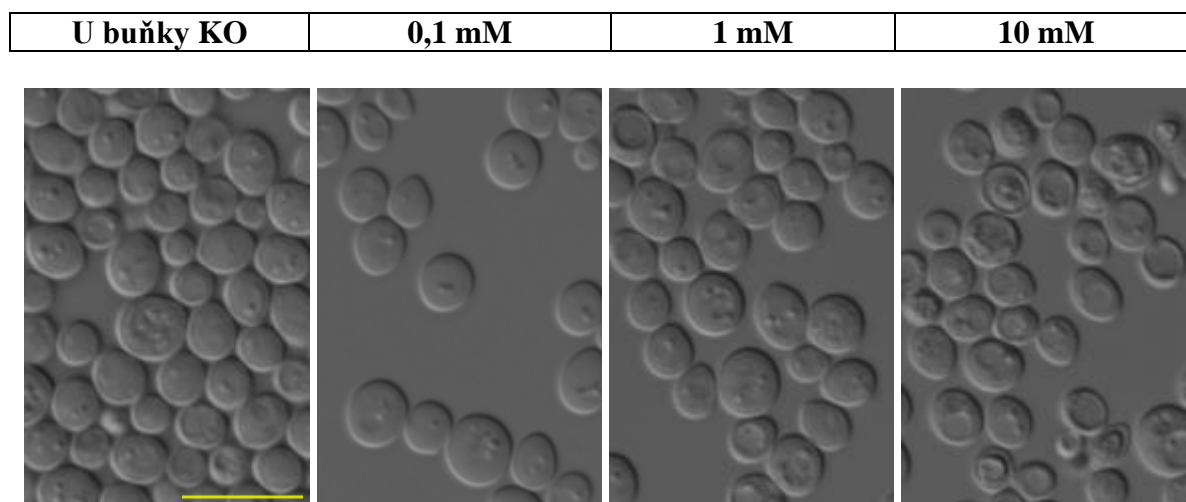
Obr. 58. Kyselina izomáselná - 4 dny působení látky na L buňky kmene BY4742

Vliv kyseliny izomáselné na morfologii U buněk byl celkově nepatrný. Při působení 10 mM koncentrace látky jsou menší změny morfologie vidět už po 1 dni působení. Po 3 a 4 dnech se morfologie buněk mění již velmi málo.

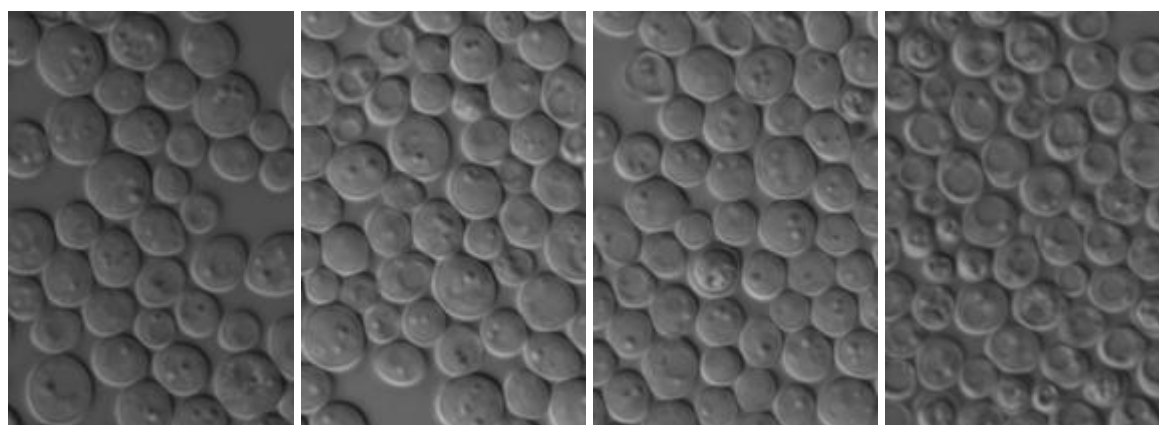
Prokazatelněji vypadal vliv kyseliny izomáselné na L buňky. Působení 10 mM koncentrace látky vyvolává velké změny morfologie buněk po 1 dni působení. Po 4 dnech působení 10 mM koncentrace jsou buňky mrtvé. U koncentrací 0,1 a 1 mM jsou změny morfologie buněk nepatrné.

### 5.1.8. Kyselina izovalerová v BY4742

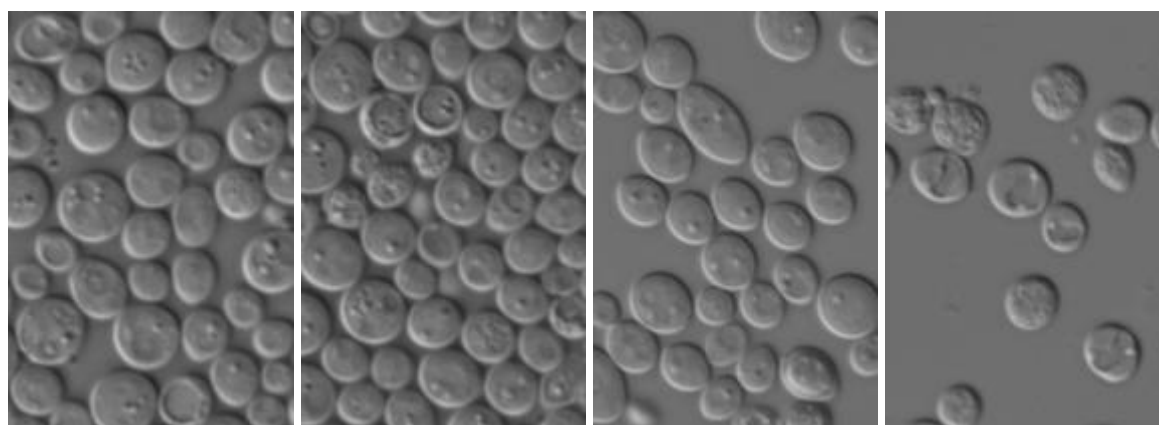
Pro studium vlivu kyseliny izovalerové jsme vybrali koncentrace 0,1; 1 a 10 mM.



Obr. 59. Kyselina izovalerová - 1 den působení látky na U buňky kmene BY4742

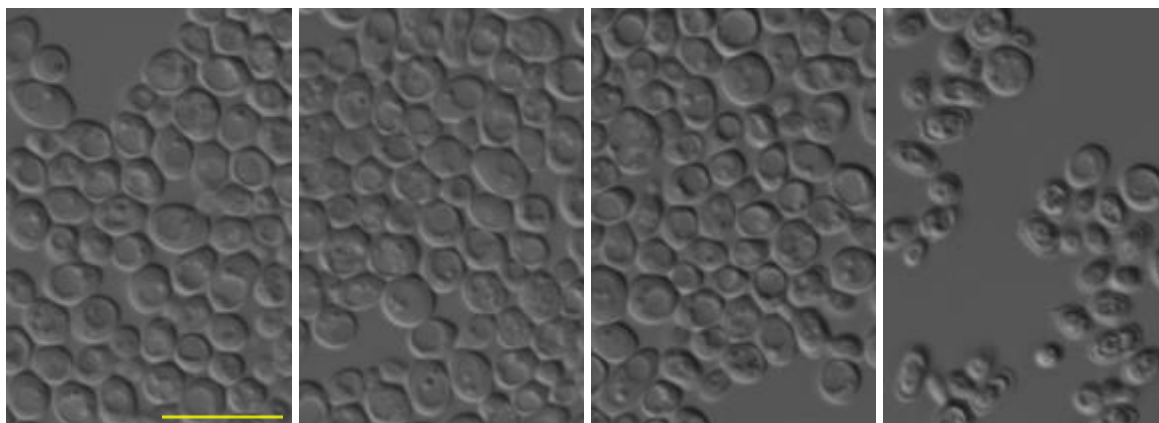


Obr. 60. Kyselina izovalerová - 3 dny působení látky na U buňky kmene BY4742

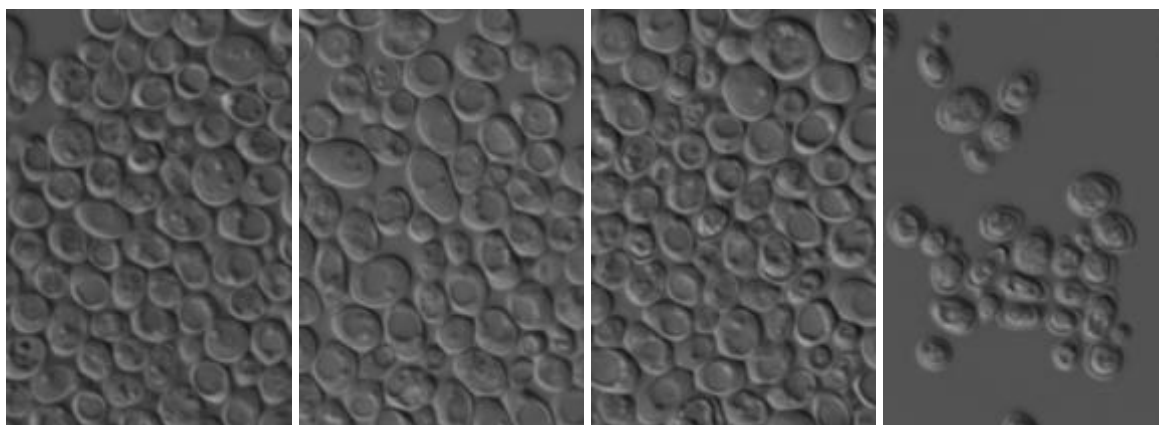


Obr. 61. Kyselina izovalerová - 4 dny působení látky na U buňky kmene BY4742

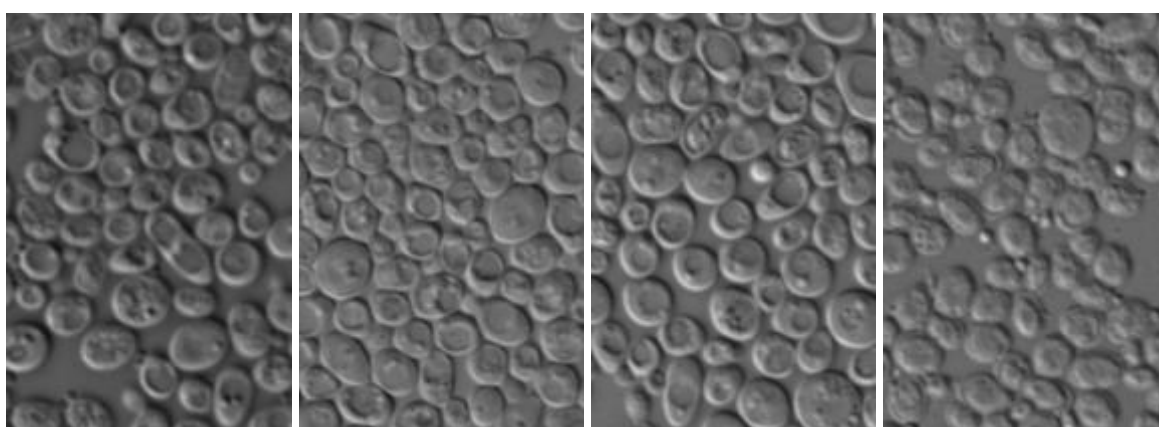
L buňky KO	0,1 mM	1 mM	10 mM
------------	--------	------	-------



Obr. 62. Kyselina izovalerová - 1 den působení látky na L buňky kmene BY4742



Obr. 63. Kyselina izovalerová - 3 dny působení látky na L buňky kmene BY4742



Obr. 64. Kyselina izovalerová - 4 dny působení látky na L buňky kmene BY4742

Vliv kyseliny izovalerové na změnu morfologie U buněk byl viditelný již po 1 dni působení 10 mM koncentrace látky. Po 4 dnech působení jsou buňky mrtvé. U koncentrací 0,1 mM a 1 mM jsou změny morfologie U buněk málo viditelné i po 3 a 4 dnech působení.

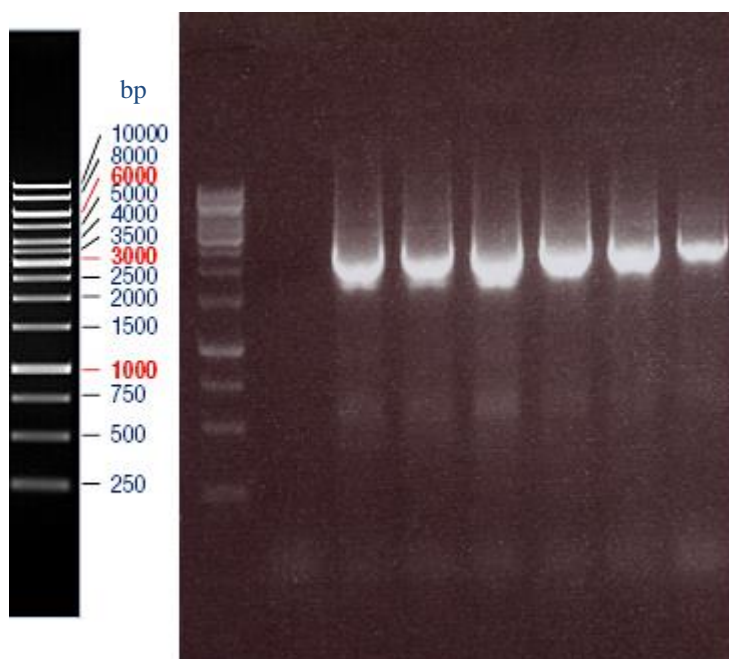
Působení kyseliny izovalerové na morfologii L buněk vykazuje nižší odolnost L buněk vůči látce oproti U buňkám. Po 1 dni působení 10 mM koncentrace látky jsou L buňky téměř

všechny mrtvé. U 1 mM koncentrace dají změny morfologie pozorovat částečně po 3 dnech působení látky a u 0,1 mM koncentrace po 4 dnech působení.

## 5.2. Konstrukce kmenů produkujících vybrané proteiny značené GFP

Proteiny Cox14p, Erg28p, Mcx1p, Rsm26p a Ski8p, Tsc13p byly vybrány na základě proteomické analýzy (prováděla Ing. Ježková a Mgr. Karel Harant) vzorků U a L buněk po působení vybraných látek. Byly vybrány ty proteiny, které se objevují v přítomnosti látek ve větším množství nebo ty, které naopak při působení látek mizí. Aby bylo možno sledovat změny koncentrace těchto proteinů v jednotlivých buňkách v průběhu vývoje kolonie, připravili jsme kmeny produkující tyto proteiny fúzované s genem GFP. Kmen produkující protein Stf1p - GFP byl již dříve zkonstruován Ing. Ladislavou Hatákovou a v této práci byl použit pro další testování působení vybraných látek

Pro konstrukci kmenů produkujících proteiny značené GFP byla nezbytná výroba integrační kazety pomocí plazmidu pKT127 (stavba a popis plazmidu viz kapitola 3.1.2.). Kazeta byla vyrobena metodou PCR – reakce s LA DNA Polymerases Mix (viz kapitola 3.2.4.1.). Správná výroba kazety se poté ověřila pomocí elektroforetické analýzy (viz kapitola 3.2.4.2., Obr. 65). Kazety se použily pro transformaci kvasinkového kmene BY4742 (podrobný popis transformace viz kapitola 3.2.4.3.). Úspěšnost transformace byla ověřena pomocí ověřovací PCR a následné elektroforetické analýzy (viz kapitola 3.2.4.4., Obr. 66).

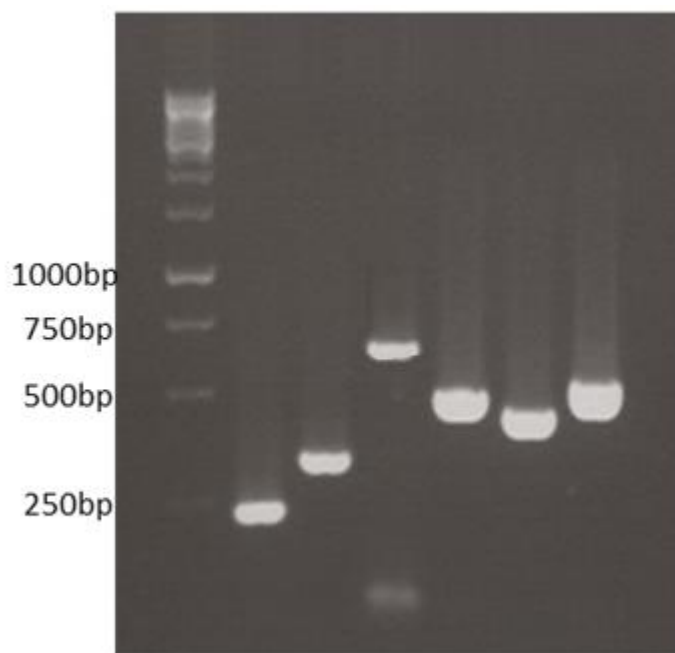


Obr. 65. Ověření úspěšné konstrukce integrační kazety pomocí elektroforetické analýzy.

Zleva: orientační měřítko, *COX14*, *ERG28*, *MXC1*, *RMS26*, *SKI8*, *TSC13*

Velikost všech konstruktů je 2526bp

Kazety byly dále použity pro transformaci kmene BY4742



Obr. 66.  
Snímek elektroforetické analýzy produktů ověřovací PCR. Pomocí analýzy byla ověřena správná integrace vkládané kazety.

Zleva: orientační měřítko, *COX14*, *ERG28*, *MCXI*, *RMS26*, *SKI8*, *TSC13*

Velikost produktů:

*COX14* – 232bp

*ERG28* – 340bp

*MCXI* – 715bp

*RSM26* – 511bp

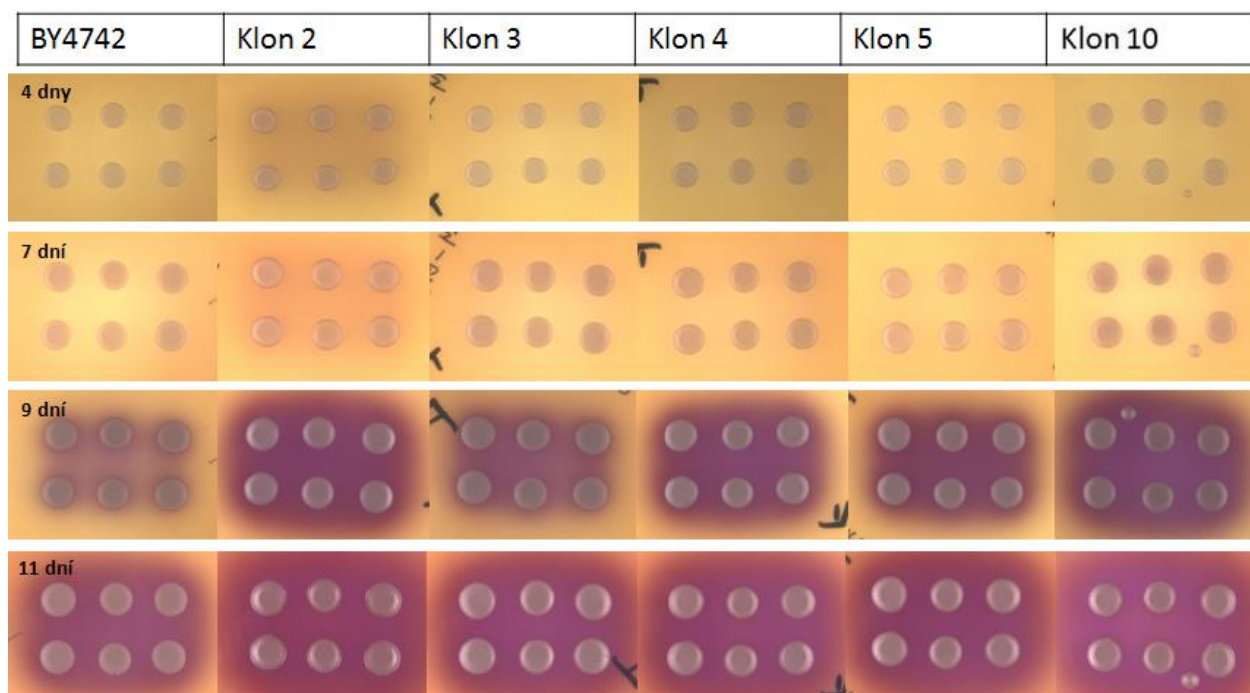
*SKI8* – 459bp

*TSC13* – 550bp

Pro každý označený gen bylo vytvořeno více kvasinkových klonů. Všechny byly ověřeny pomocí PCR. Dále byl porovnán vývoj kolonií tvořených těmito klony s vývojem kolonií rodičovského kmene. Pokud nedojde ke změně funkce daného proteinu po fúzi s GFP, měly by se kolonie klonů vyvíjet stejně jako kolonie kmene rodičovského. Kmeny byly nakapány pro tvorbu obřích kolonií (viz kapitola 3.2.3.) na pevné GM + BKP médium a byl pozorován vývoj kolonie a alkalizace prostředí u jednotlivých kmenů (viz kapitola 5.3.). Paralelně byly inokulovány na pevné GM médium pro následnou mikroskopii řezů diferencovanými koloniemi pro fluorescenční pozorování GFP označeného proteinu (viz kapitola 5.4.). Na základě získaných výsledků byl vybrán jeden kmen pro daný gen a ten byl inkubován s jednou z vybraných látek a následně byl pozorován pod mikroskopem (popsáno dále v kapitole 5.5.). U všech těchto pozorování byl přítomen kontrolní rodičovský kmen BY4742.

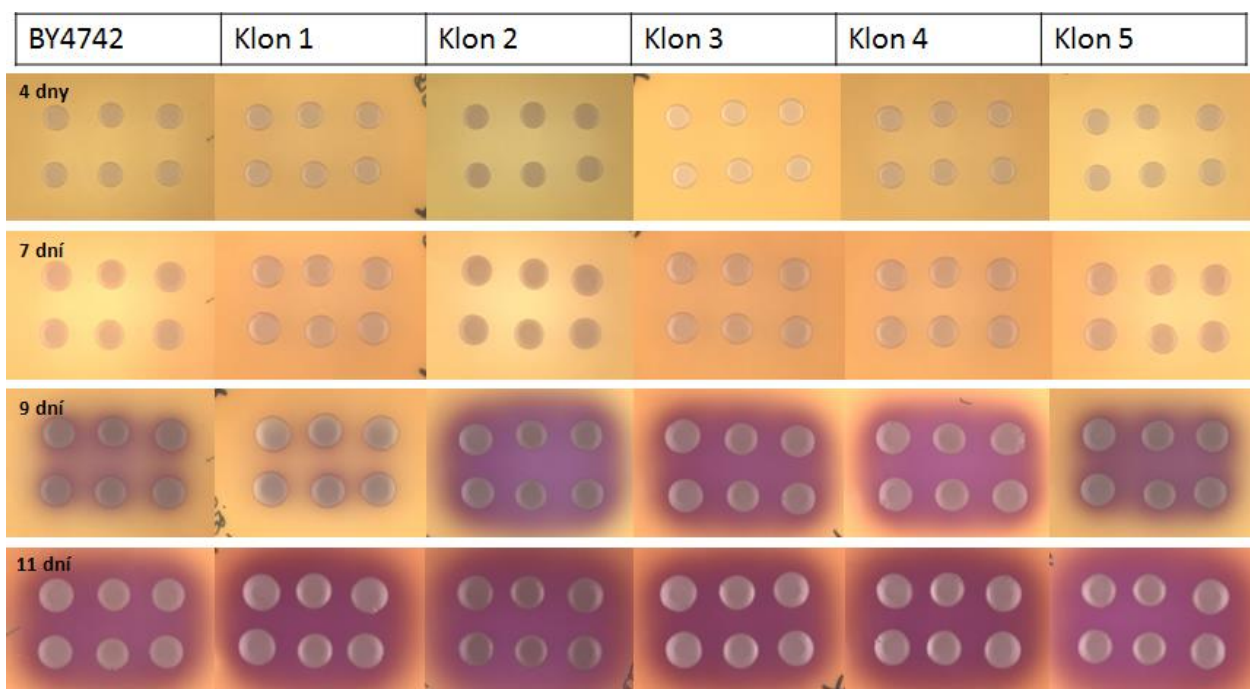
### 5.3. Alkalizační test zkonstruovaných kmenů

Pro potvrzení správného vývoje zkonstruovaných kmenů byl proveden alkalizační test na obřích koloniích. Kolonie kvasinek byly inokulovány v šesticích na GM + BKP pevné médium (viz kapitoly 1.3.7. a 2.3.2.). K alkalizaci média během vývoje kolonií docházelo většinou kolem 10. – 14. dne. Alkalizace se projevila fialovým zabarvením kolem kolonií díky přítomnosti pH indikátoru BKP. Pro každý kmen bylo pozorováno několik klonů, které byly porovnávány s rodičovským kmenem BY4742.



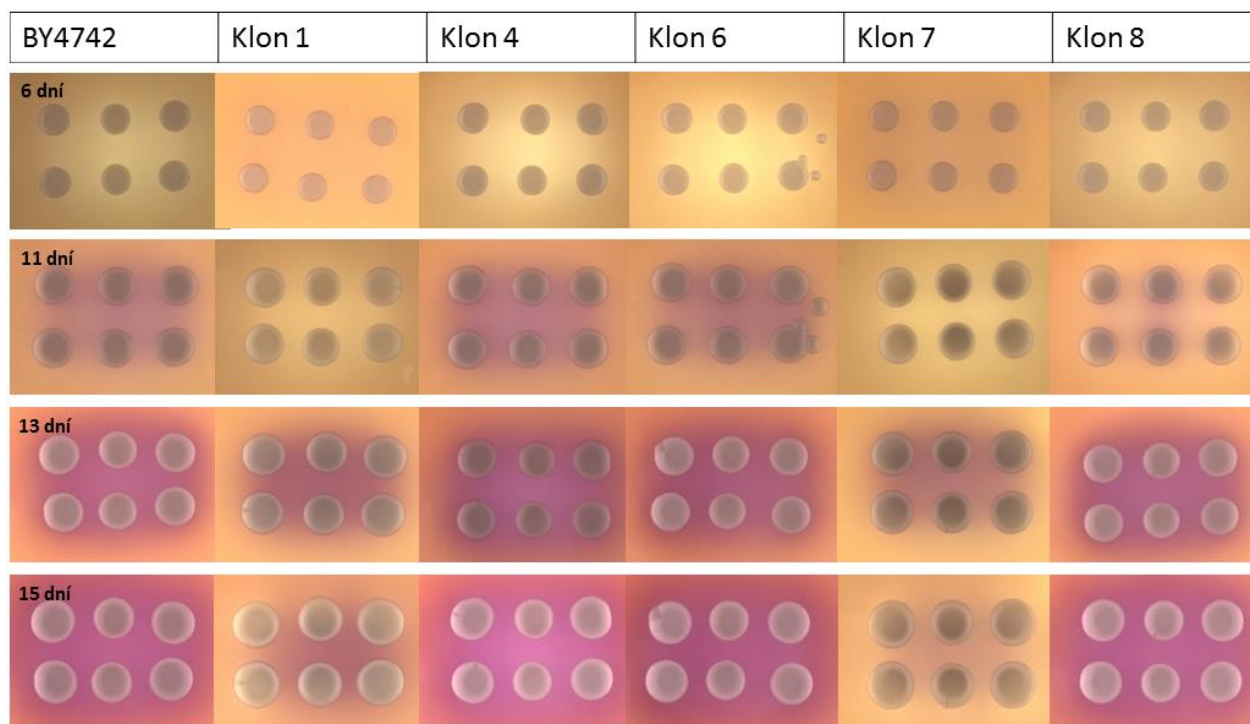
Obr. 67. Kmen *COX14 – GFP*. Průběh alkalizace média vybraných klonů kmene v porovnání s rodičovským kmenem BY4742.

Kolonie tvořené klony kmene produkujícího Cox14p - GFP slabě alkalizovaly již 9. den, dokonce dříve než rodičovský kmen BY4742. 11. den se alkalizace projevila u všech klonů i u rodičovského kmene. Morfologie kolonií klonů se výrazně nelišila od rodičovského kmene BY4742. Pro další práci byl vybrán klon 10.



Obr. 68. Kmen *ERG28 – GFP*. Průběh alkalizace média vybraných klonů kmene v porovnání s rodičovským kmenem BY4742.

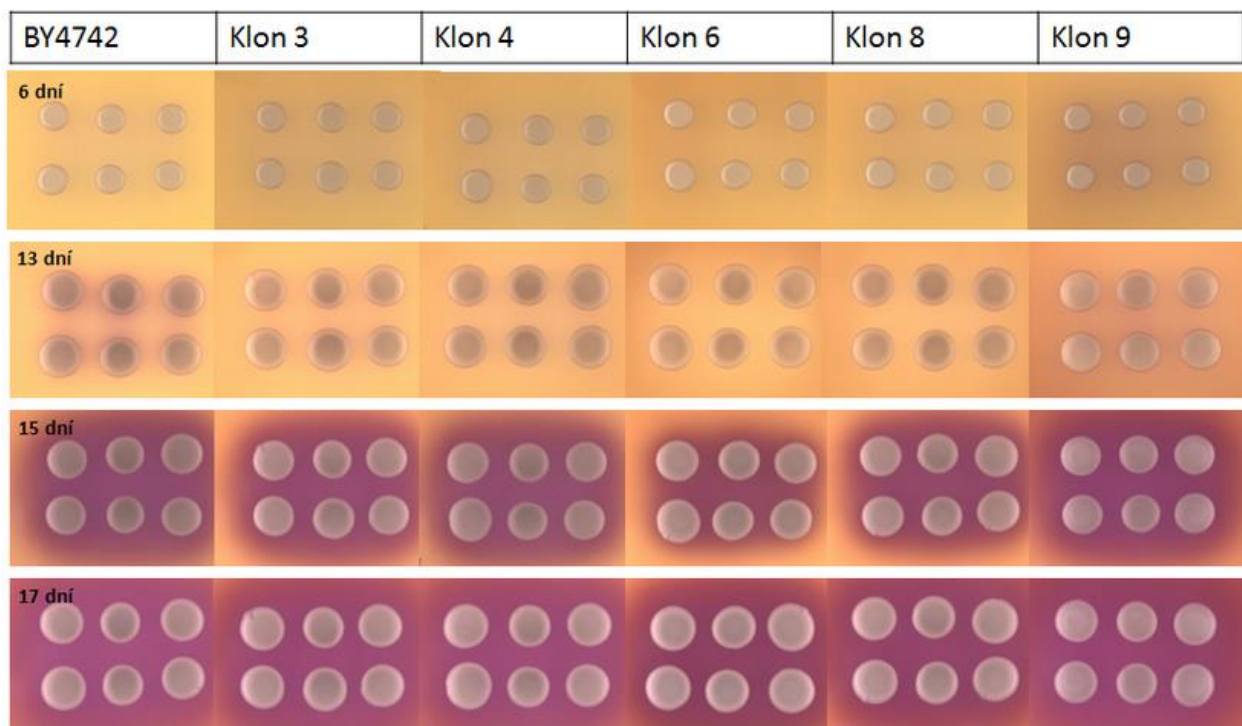
Kolonie tvořené klony kmene produkujícího Erg28p - GFP se příliš nelišily v morfologii ani v průběhu alkalizace od rodičovského kmene BY4742. Pro další práci byl vybrán klon 5.



Obr. 69. Kmen *MCXI – GFP*. Průběh alkalizace média vybraných klonů kmene v porovnání s rodičovským kmenem BY4742.



Kolonie tvořené klony kmene produkujícího Mcx1p – GFP vykazovaly rozdílný průběh alkalizace, která začala u rodičovského kmene při 11. dni. Stejně tak tomu bylo u klonů 4, 6 a 8. Dostatečná alkalizace rodičovského kmene BY4742 a těchto klonů proběhla kolem 13. a 14. dne. Klony 1 a 7 alkalizovaly pouze slabě. V morfologii se klony nelišily od rodičovského kmene. Pro další práci byl vybrán klon 4.



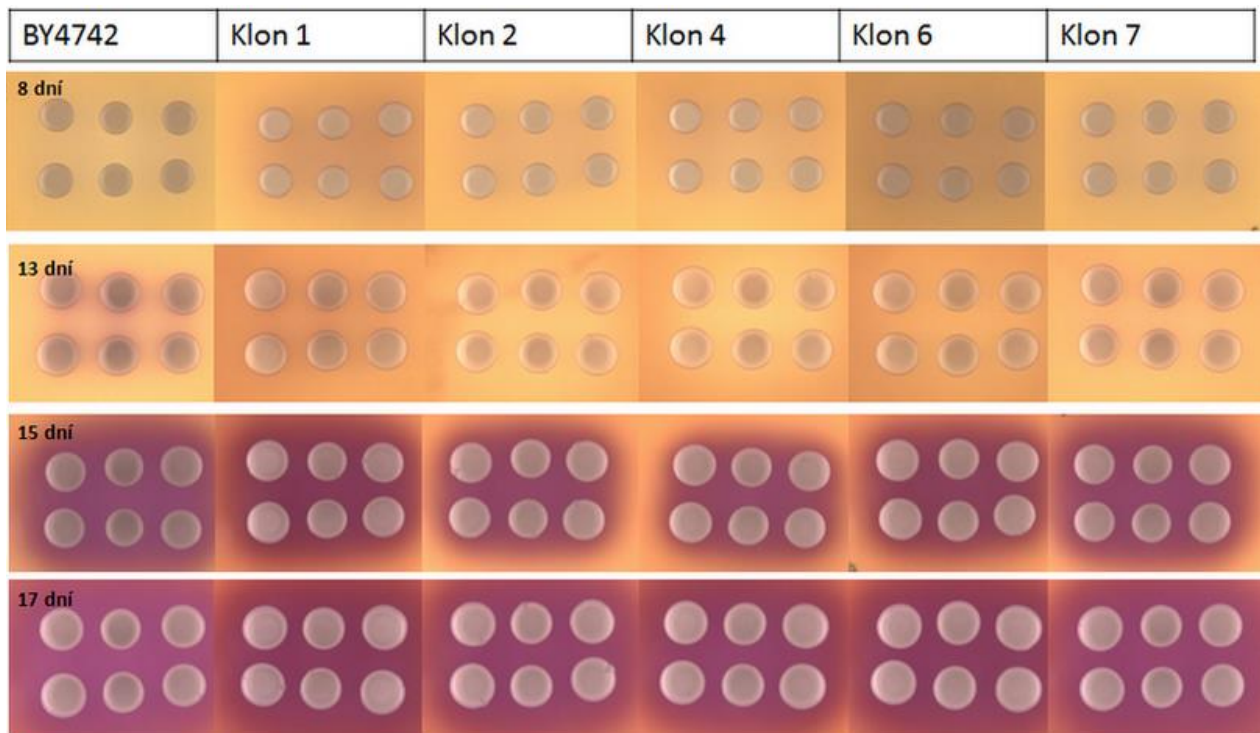
Obr. 70. Kmen *RSM26 – GFP*. Průběh alkalizace média vybraných klonů kmene v porovnání s rodičovským kmenem BY4742.

Kolonie tvořené klony kmene produkujícího Rsm26p – GFP byly morfologicky i průběhem alkalizace stejně jako rodičovský kmen BY4742. Alkalizace nastala později až během 15. dne. Pro další práci byl vybrán klon 3.



Obr. 71. Kmen *SKI8 – GFP*. Průběh alkalizace média vybraných klonů kmene v porovnání s rodičovským kmenem BY4742.

Kolonie tvořené klony kmene produkujícího Ski8p – GFP se morfologicky nelišily oproti rodičovskému kmeni BY4742. Alkalizace nastala 10. den, kdy pouze klon 3 měl viditelně slabší průběh alkalizace než rodičovský kmen BY4742. Pro další práci byl vybrán klon 8.



Obr. 72. Kmen *TSC13 – GFP*. Průběh alkalizace média vybraných klonů kmene v porovnání s rodičovským kmenem BY4742.

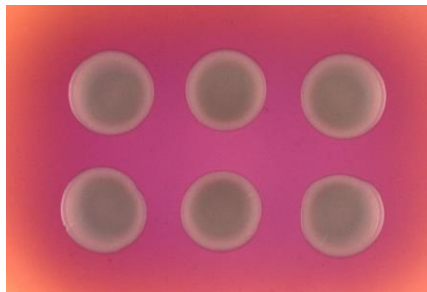
Kolonie tvořené klony kmene produkujícího Tsc13p – GFP se morfologicky ani průběhem alkalizace nelišily od rodičovského kmene BY4742. Alkalizace nastala 15. den u všech klonů. Pro další práci byl vybrán klon 7.

#### 5.4. Lokalizace buněk produkujících fúzní proteiny v rámci diferencovaných kolonií

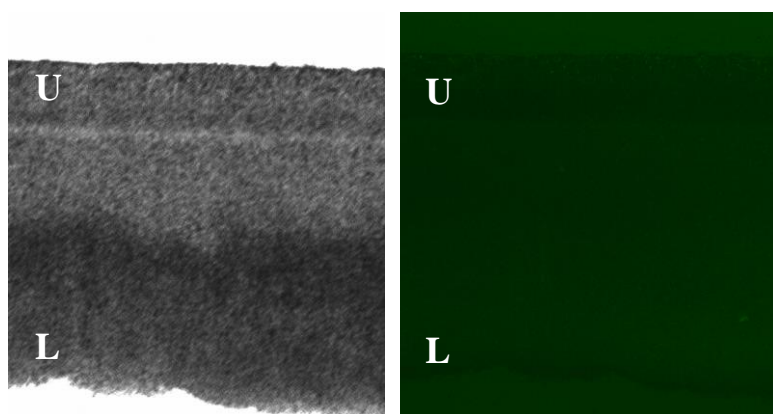
Aby bylo možno zjistit, které buňky v kolonii produkují fúzní protein, byly připraveny mikroskopické řezy koloniemi jednotlivých kmenů na mikrotomu (metoda viz kapitola 3.2.5.2.). Pro kontrolu byl vyroben i řez kontrolního kmene BY4742 a mikroskopován za stejných podmínek (fluorescenční signál zde pochází z autofluorescence vlastních buněk). Řezy byly mikroskopovány ve viditelném světle s Nomarski kontrastem a pomocí fluorescenční mikroskopie. Lokalizace buněk produkujících fúzní proteiny byla sledována na 14 denních alkalizujících koloniích.

## KONTROLNÍ KMEN *BY4742*

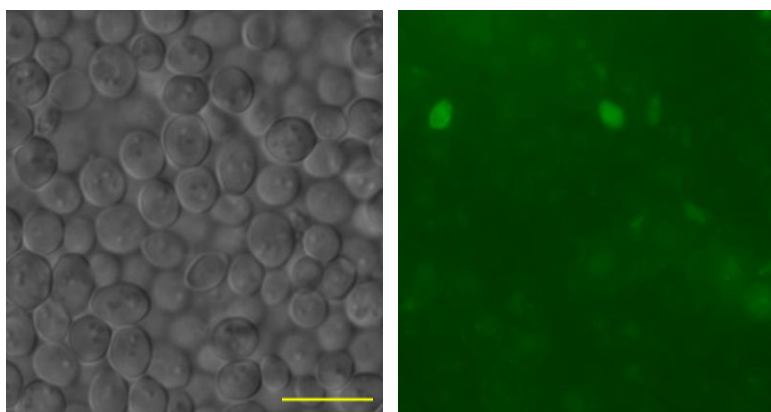
Vertikální řez kolonií kmene *BY4742* prokázal pouze autofluorescenci jednotlivých buněk. U kmene není produkován protein GFP, a proto zde není žádný další fluorescenční signál.



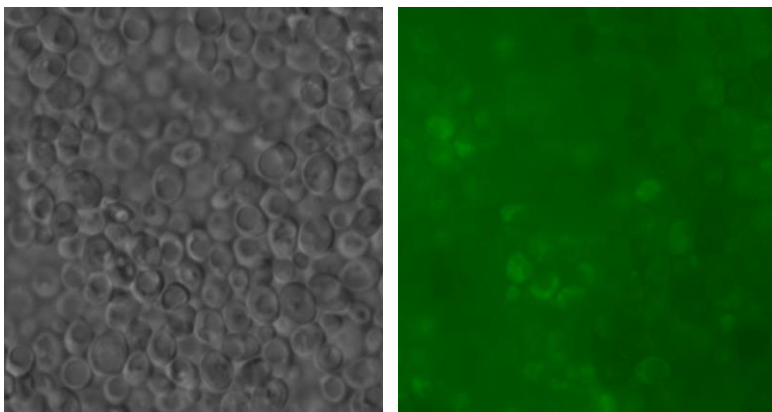
Obr. 73. Alkalizační test vývoje kolonií kmene *BY4742*, 14 denní kolonie



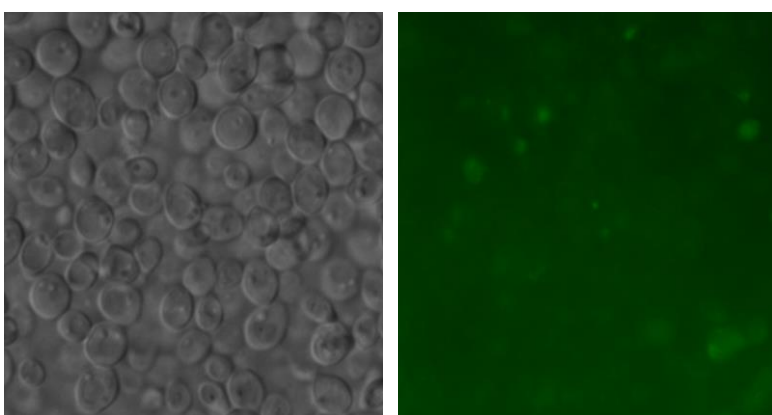
Obr. 74. Vertikální řez kolonií kmene *BY4742*, zvětšení 50x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoziční 2 sekundy)



Obr. 75. U buňky. Vertikální řez kolonií kmene *BY4742*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoziční 2 sekundy)  
Měřítka odpovídá 10  $\mu\text{m}$ . Zvětšení je u všech obrázků buněk v kapitole 5.4. stejné.



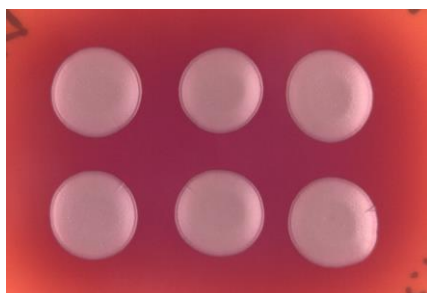
Obr. 76. L buňky. Vertikální řez kolonií kmene *BY4742*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)



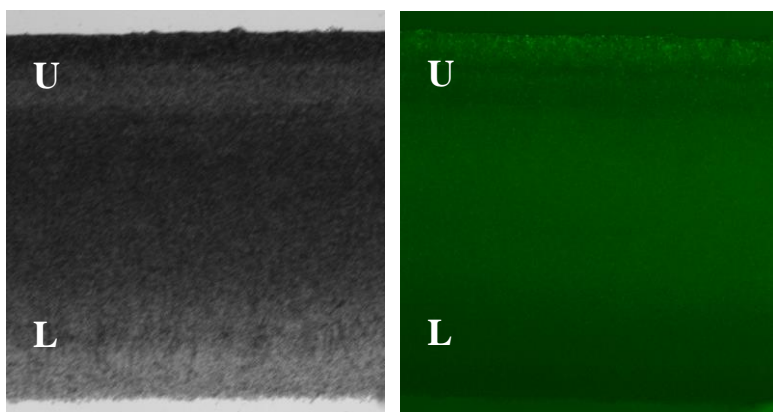
Obr. 77. Přechod U a L buněk. Vertikální řez kolonií kmene *BY4742*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)

### COX14 – GFP klon 10

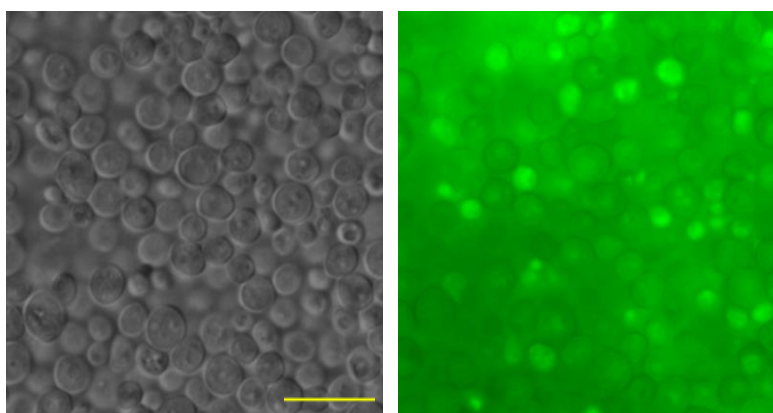
Cox14p hraje roli v sestavování cytochrom oxidázy v mitochondriích kvasinek (Glerum, Koerner et al. 1995). Vertikální řez kolonií kmene *COX14 – GFP* potvrzuje lokalizaci proteinu Cox14p – GFP v mitochondriích. Fluorescenční signál je slabý a není vidět velký rozdíl produkce proteinu mezi U a L buňkami.



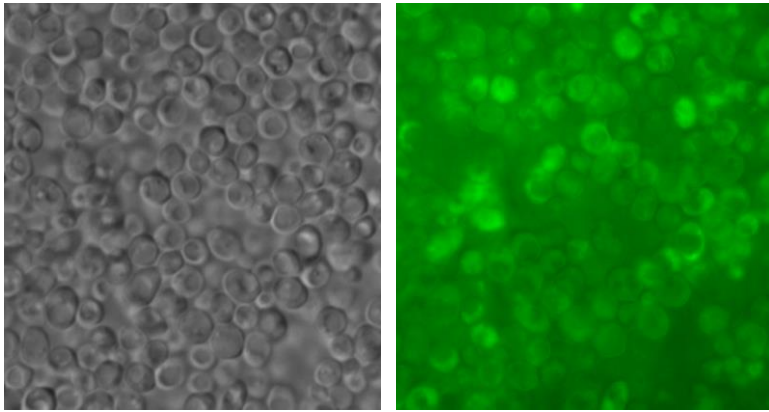
Obr. 78. Alkalizační test vývoje kolonií kmene *COX14 – GFP klon 10*, 14 denní kolonie



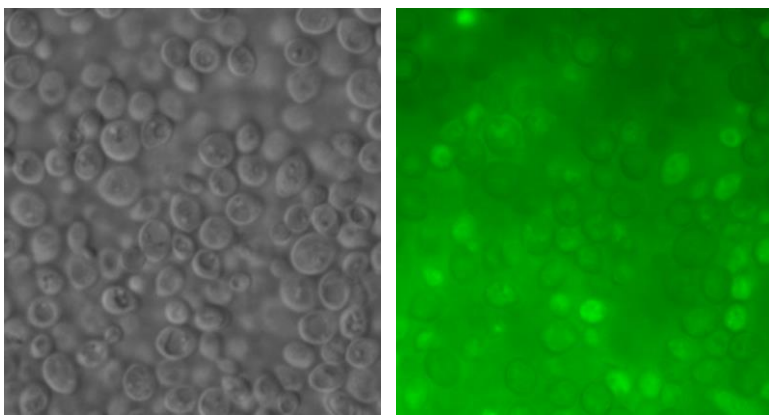
Obr. 79. Vertikální řez kolonií kmene *COX14 – GFP klon 10*, zvětšení 50x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoziční 2 sekundy)



Obr. 80. U buňky. Vertikální řez kolonií kmene *COX14 – GFP klon 10*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoziční 2 sekundy)



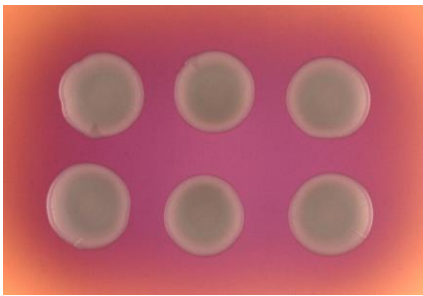
Obr. 81. L buňky. Vertikální řez kolonií kmene *COX14 – GFP klon 10*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)



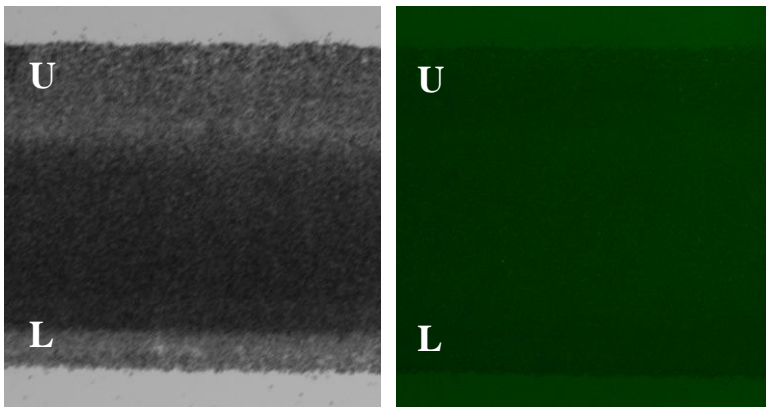
Obr. 82. Přejchod U a L buněk. Vertikální řez kolonií kmene *COX14 – GFP klon 10*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)

### ERG28 – GFP klon 5

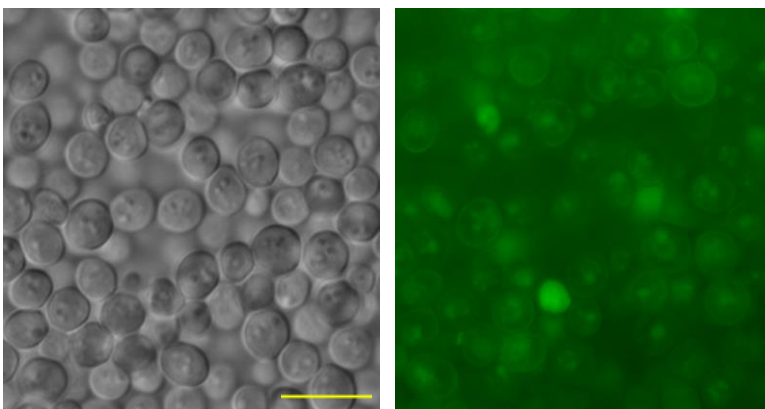
Erg28p je dle literatury lokalizován v membráně endoplazmatického retikula (Hughes, Marton et al. 2000). Vertikální řez kolonií kmene *ERG28 - GFP* prokázal lokalizaci proteinu v endoplazmatickém retikulu. Fluorescenční signál je silnější u U buněk, a proto se v nich bude protein více vyskytovat. L buňky vykazují kromě fluorescence proteinu také autofluorescenci. Jasnější lokalizace bez většího šumu autofluorescence u L buněk je vidět při samostatném odebrání L buněk a následném mikroskopování (viz kapitola 5.5.).



Obr. 83. Alkalizační test vývoje kolonií kmene *ERG28 – GFP klon 5*, 14 denní kolonie

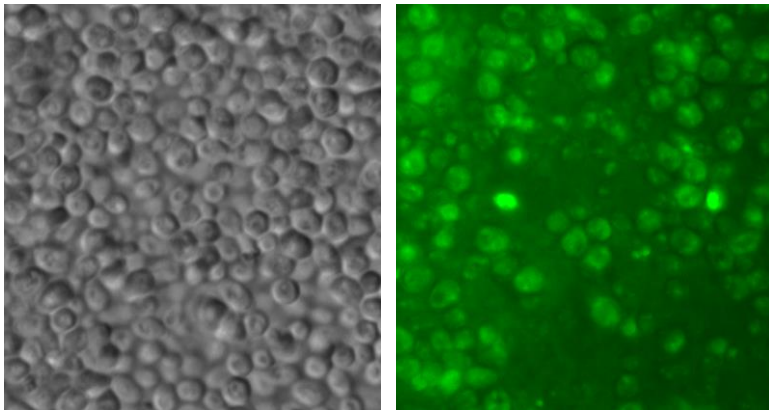


Obr. 84. Vertikální řez kolonií kmene *ERG28 – GFP klon 5*, zvětšení 50x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoziční 2 sekundy)

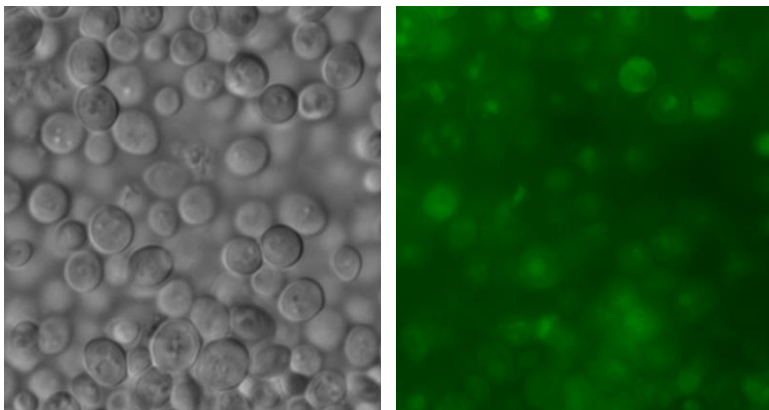


Obr. 85. U buňky. Vertikální řez kolonií kmene *ERG28 – GFP klon 5*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoziční 2 sekundy)





Obr. 86. L buňky. Vertikální řez kolonií kmene *ERG28 – GFP klon 5*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)



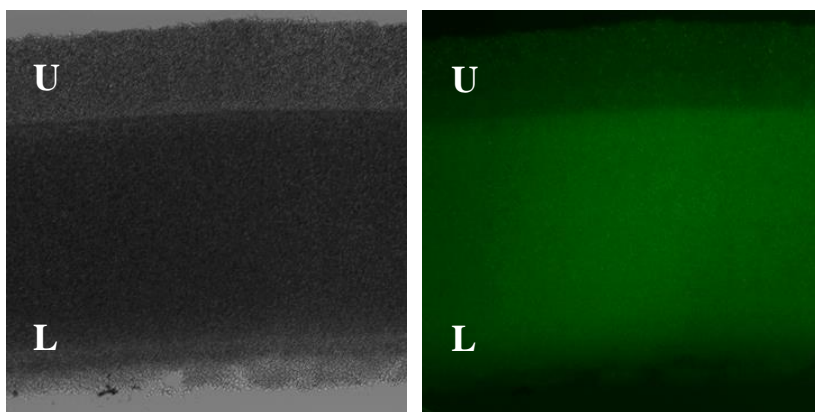
Obr. 87. Přechod U a L buněk. Vertikální řez kolonií kmene *ERG28 – GFP klon 5*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)

### MCXI – GFP klon 4

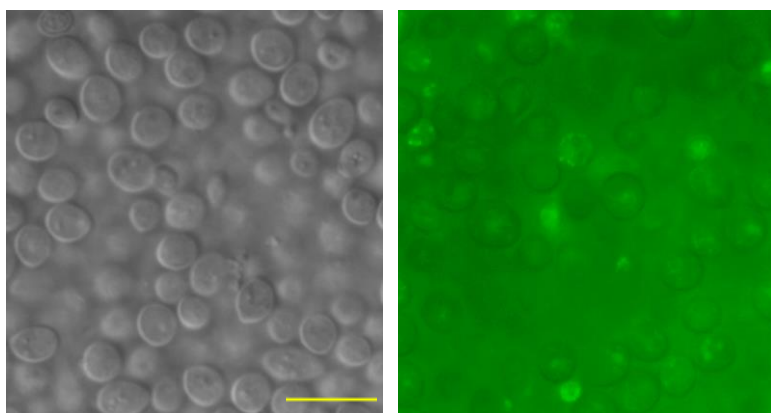
Mcx1p je podle dosavadní literatury lokalizován v mitochondriální matrix (van Dyck, Dembowski et al. 1998). Vertikální řez kolonií kmene *MCXI - GFP* lokalizaci proteinu potvrzuje. Protein je dle výsledků produkován více v L buňkách. V U buňkách se produkce proteinu objevuje také, ale fluorescenční signál je mnohem slabší.



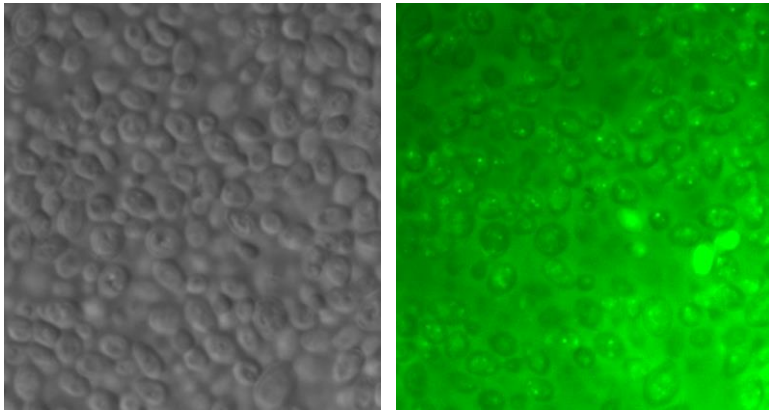
Obr. 88. Alkalizační test vývoje kolonií kmene *MCXI – GFP klon 4*, 14 denní kolonie



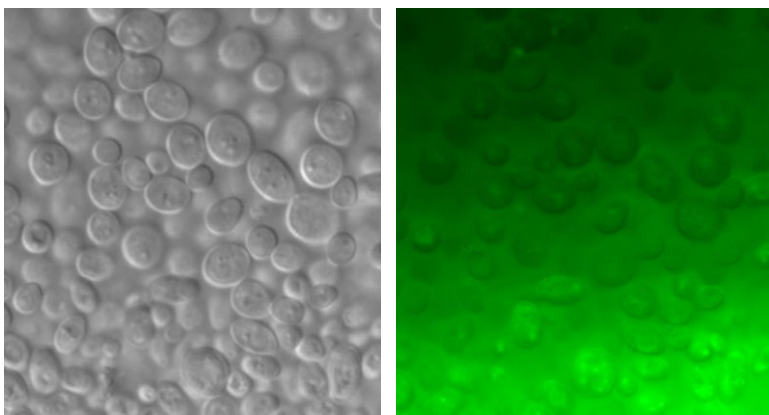
Obr. 89. Vertikální řez kolonií kmene *MCXI – GFP klon 4*, zvětšení 100x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoziční 2 sekundy)



Obr. 90. U buňky. Vertikální řez kolonií kmene *MCXI – GFP klon 4*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoziční 2 sekundy)



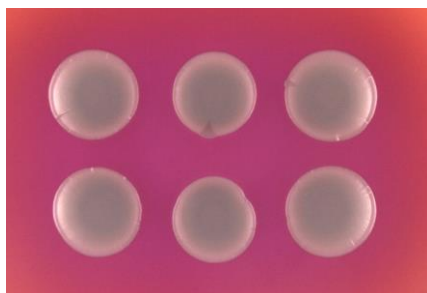
Obr. 91. L buňky. Vertikální řez kolonií kmene *MCXI – GFP klon 4*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)



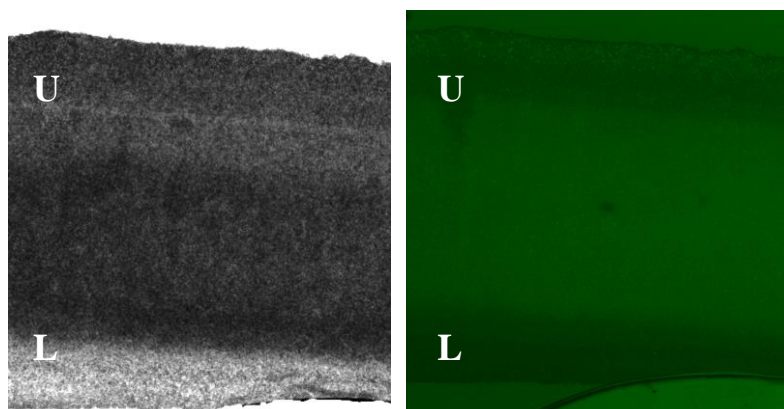
Obr. 92. Přechod U a L buněk. Vertikální řez kolonií kmene *MCXI – GFP klon 4*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)

### RSM26 – GFP klon 3

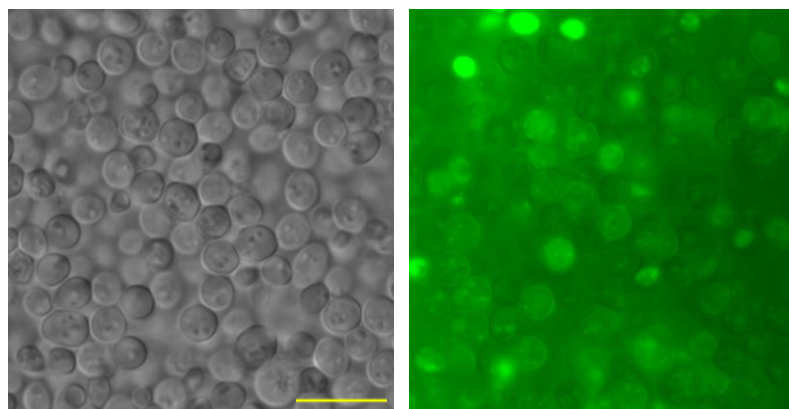
Rsm26p je podle literatury mitochondriální protein (Saveanu, Fromont-Racine et al. 2001). Vertikální řez kolonií kmene *RSM26 – GFP* potvrzuje lokalizaci proteinu. Dle řezu se zdá být intenzita fluorescenčního signálu větší u L buněk. Ovšem další experimenty vykazují velmi podobnou fluorescenci (viz kapitola 5.5.). Vyšší fluorescence L buněk je pravděpodobně dána také šumem z autofluorescence.



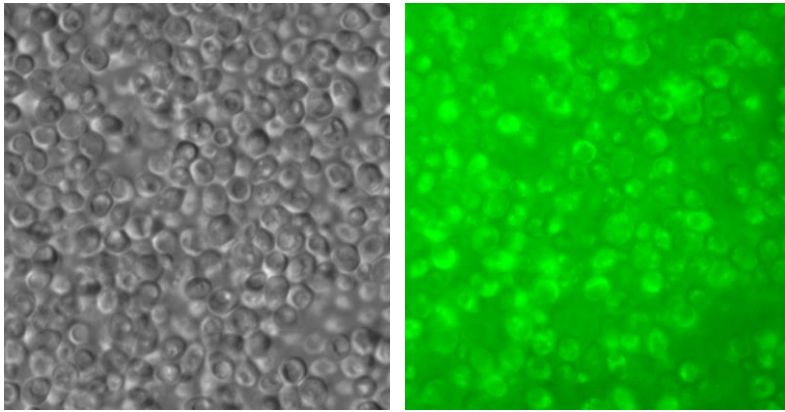
Obr. 93. Alkalizační test vývoje kolonií kmene *RSM26 – GFP klon 3*, 14 denní kolonie



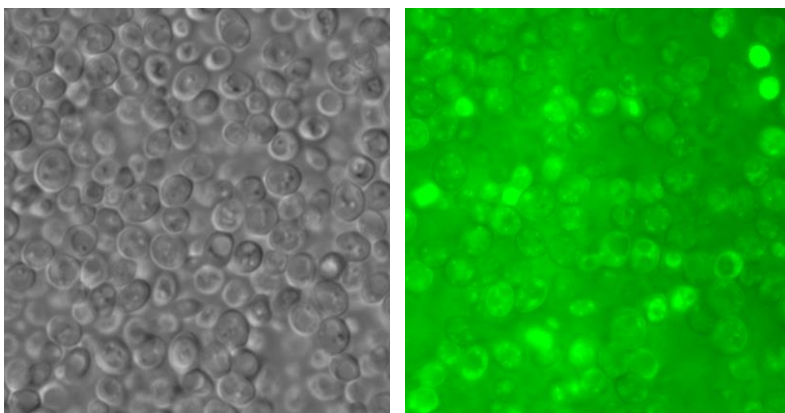
Obr. 94. Vertikální řez kolonií kmene *RSM26 – GFP klon 3*, zvětšení 50x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)



Obr. 95. U buňky. Vertikální řez kolonií kmene *RSM26 – GFP klon 3*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)



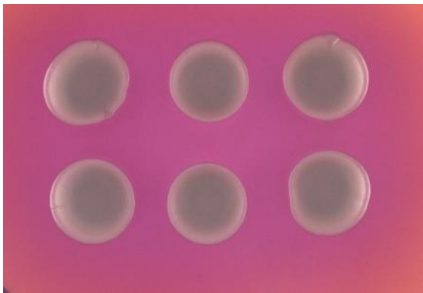
Obr. 96. L buňky. Vertikální řez kolonií kmene *RSM26 – GFP klon 3*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)



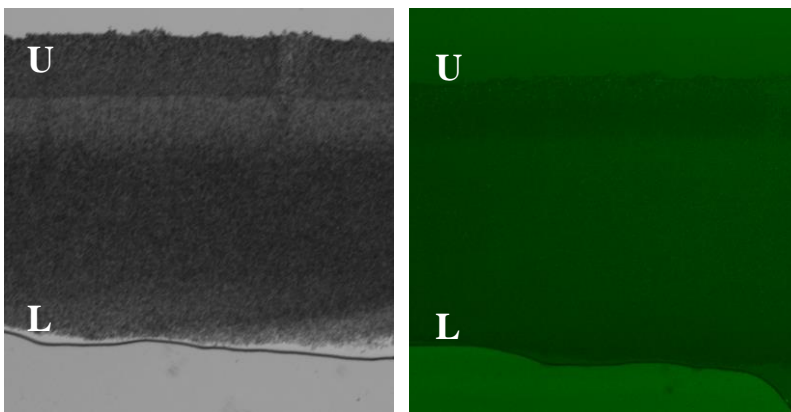
Obr. 97. Přechod U a L buněk. Vertikální řez kolonií kmene *RSM26 – GFP klon 3*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)

### SKI8 – GFP klon 8

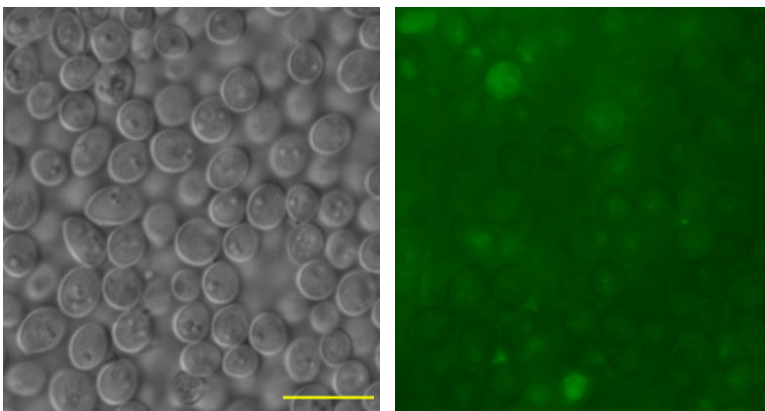
Ski8p je protein, který je součástí cytoplazmatického SKI komplexu (Anderson and Parker 1998, Madrona and Wilson 2004). Produkce proteinu je viditelná u U i L buněk kmene *SKI8 – GFP*. Celkově je síla fluorescenčního signálu slabá u obou typů buněk, i přesto je u L buněk lokalizace proteinu ztelnější.



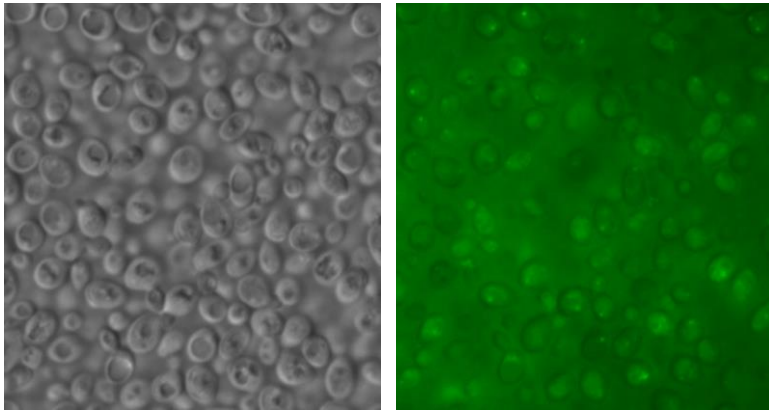
Obr. 98. Alkalizační test vývoje kolonií kmene *SKI8 – GFP klon 8*, 14 denní kolonie



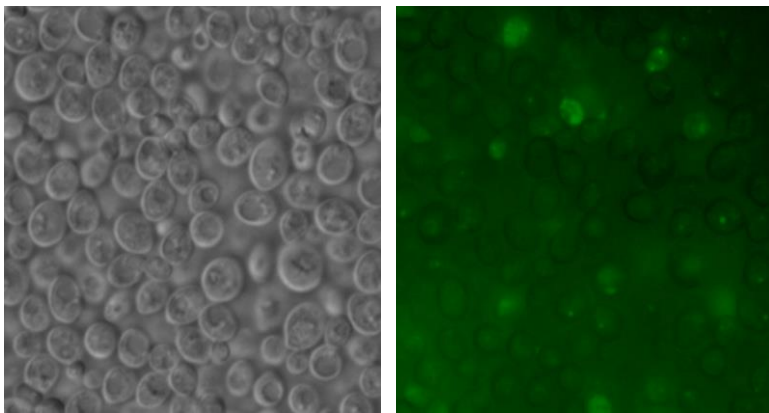
Obr. 99. Vertikální řez kolonií kmene *SKI8 – GFP klon 8*, zvětšení 50x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoziční 2 sekundy)



Obr. 100. U buňky. Vertikální řez kolonií kmene *SKI8 – GFP klon 8*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoziční 2 sekundy)



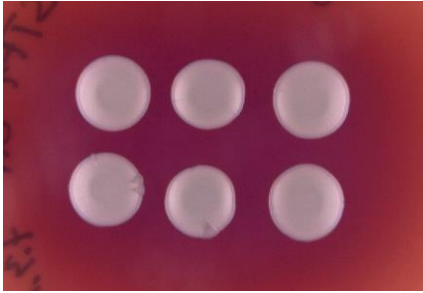
Obr. 101. L buňky. Vertikální řez kolonií kmene *SKI8 – GFP klon 8*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)



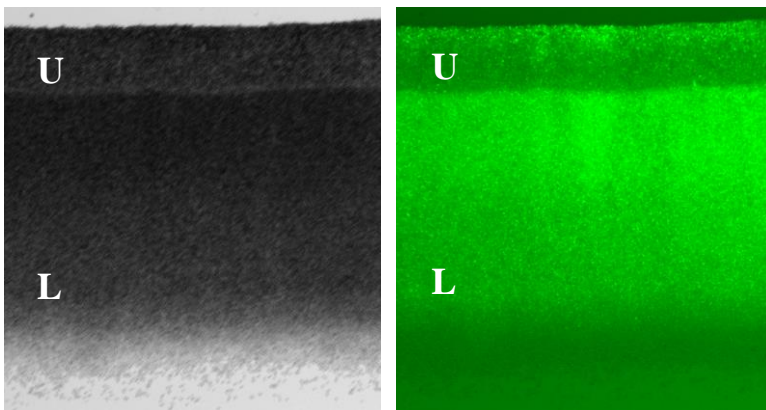
Obr. 102. Přechod U a L buněk. Vertikální řez kolonií kmene *SKI8 – GFP klon 8*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)

### *STF1 – GFP*

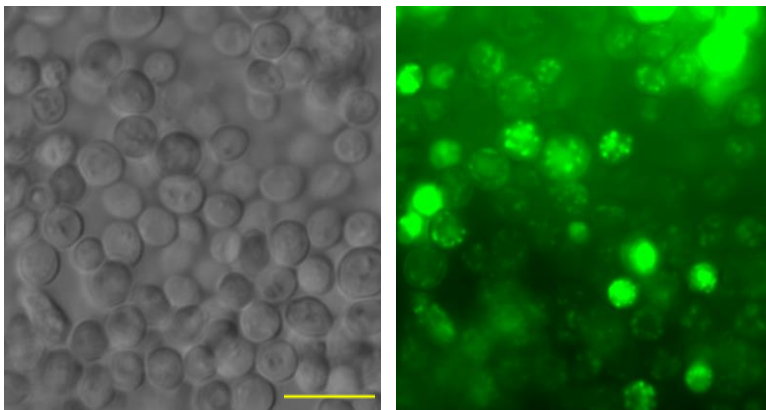
Jedná se o mitochondriální stabilizační faktor inhibitoru F1F0 ATPázy (Dienhart, Pfeiffer et al. 2002). Vertikální řez kolonií kmene *STF1 – GFP* potvrzuje produkci proteinu v mitochondriích. Fluorescenční signál je velmi silný u U i L buněk. Pomocí dalších výsledků (viz kapitola 5.5.) byla ověřena o něco silnější produkce v U buňkách. U řezu je sílu produkce nejasná pravděpodobně díky vyšší míře autofluorescence u L buněk.



Obr. 103. Alkalizační test vývoje kolonií kmene *STF1 – GFP*, 14 denní kolonie

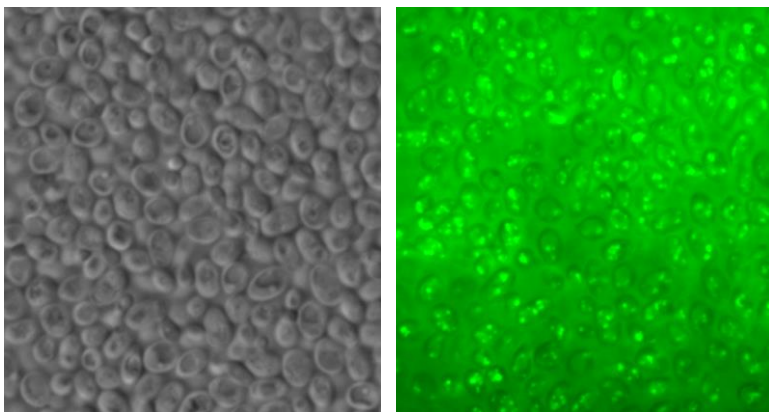


Obr. 104. Vertikální řez kolonií kmene *STF1 – GFP*, zvětšení 50x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoziční 2 sekundy)

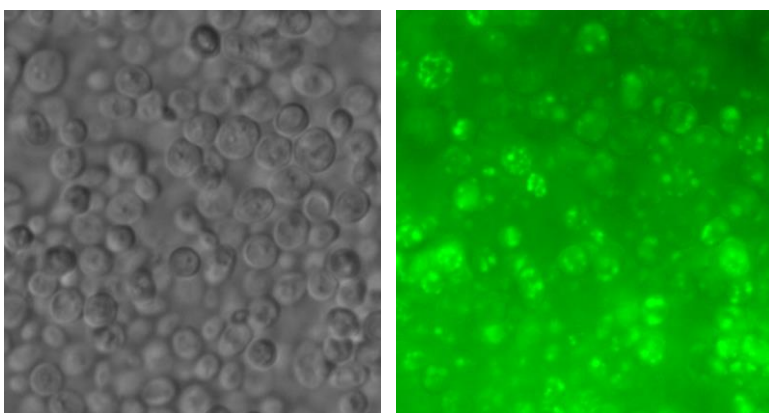


Obr. 105. U buňky. Vertikální řez kolonií kmene *STF1 – GFP*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoziční 2 sekundy)





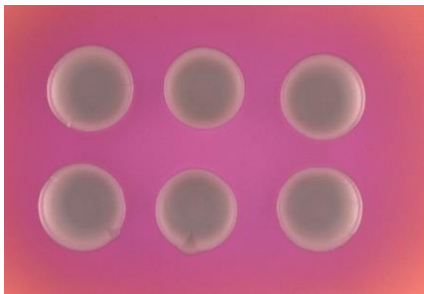
Obr. 106. L buňky. Vertikální řez kolonií kmene *STF1 – GFP*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)



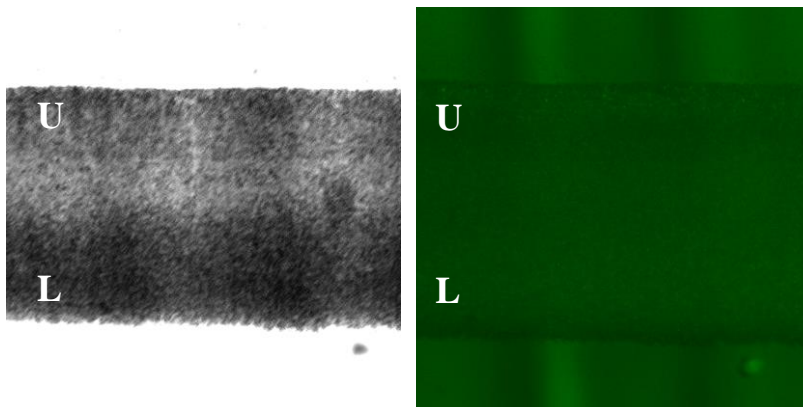
Obr. 107. Přechod U a L buněk. Vertikální řez kolonií kmene *STF1 – GFP*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)

### TSC13 – GFP klon 1

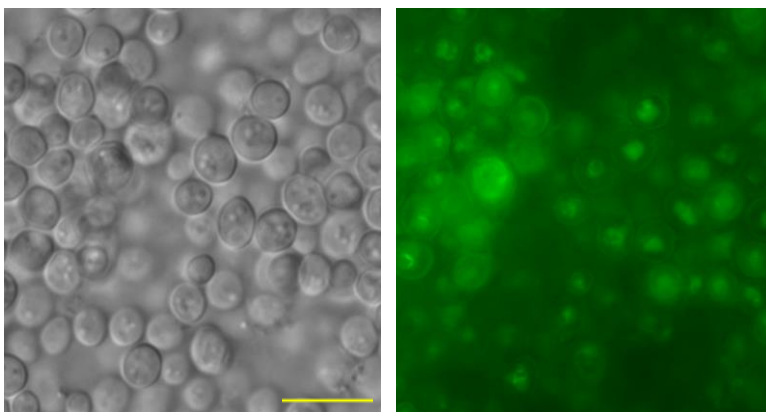
Tsc13p je enoyl – reduktáza vyskytující se v endoplazmatickém retikulu. Lokalizace je z literatury také potvrzena v místech interakce jaderného a vakuolárního obalu (Severs, Jordan et al. 1976, Pan, Roberts et al. 2000, Kohlwein, Eder et al. 2001). Vertikální řez kolonií kmene *TSC13 – GFP* potvrzuje lokalizaci proteinu v endoplazmatickém retikulu. Lokalizace proteinové interakce jaderného a vakuolárního obalu je špatně viditelná, ale byla ověřena v dalších výsledcích (viz kapitola 5.5.). Fluorescenční signál je velmi podobný u U i L buněk.



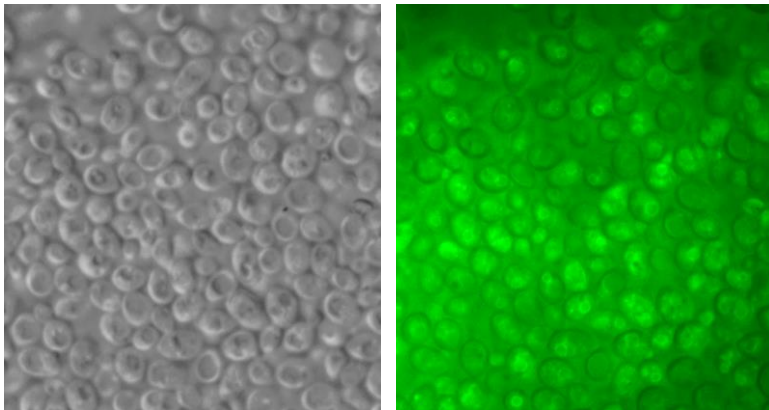
Obr. 108. Alkalizační test vývoje kolonií kmene *TSC13 – GFP klon 7*, 14 denní kolonie



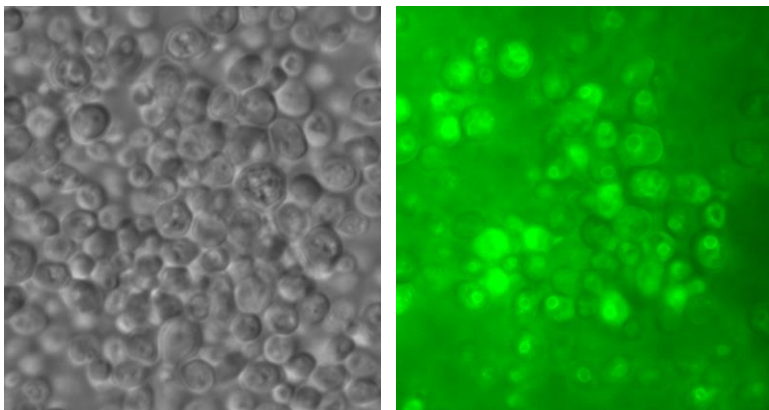
Obr. 109. Vertikální řez kolonií kmene *TSC13 – GFP klon 7*, zvětšení 50x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoze 2 sekundy)



Obr. 110. U buňky. Vertikální řez kolonií kmene *TSC13 – GFP klon 7*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expoze 2 sekundy)



Obr. 111. L buňky. Vertikální řez kolonií kmene *TSC13 – GFP klon 7*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)



Obr. 112. Přechod U a L buněk. Vertikální řez kolonií kmene *TSC13 – GFP klon 7*, zvětšení 1000x  
Vlevo kontrast Nomarski, vpravo fluorescence (expozice 2 sekundy)

## 5.5. Test vlivu vybraných látek na zkonstruované kmeny a lokalizaci jednotlivých proteinů

Výše popsané kmeny byly použity pro získání informací o produkci jednotlivých fúzních proteinů po působení vybraných látek. Obří kolonie byly vypěstovány na pevném GM médiu a stejně jako v kapitole 5.1. byla odebrána biomasa U a L buněk. Pro kontrolu vývoje kolonií a nástupu alkalizace byly obří kolonie paralelně pěstovány i na pevném GM + BKP médiu. Buňky z tohoto média nelze použít pro studium lokalizace fluorescence GFP proteinů, protože přítomné BKP znemožňovalo určit správnou lokalizaci GFP značených proteinů při fluorescenční mikroskopii. U a L buňky byly resuspendovány ve vodě na koncentraci 20 mg biomasy/ml a kultivace v přítomnosti vybraných látek probíhala vždy 1,5 hodiny. Poté byly vzorky mikroskopovány pod zvětšením 1000x a to při kontrastu Nomarski i při fluorescenční mikroskopii, která umožnila získat informace o lokalizaci fúzních GFP proteinů. Jako kontrola sloužily stejné buňky kultivované stejnou dobu pouze ve vodě, tedy bez přídavku studované látky.

Na základě výsledků získaných v kapitole 5.1. byly pro tyto pokusy vybrány čtyři látky, které se při předešlých koncentračních testech zdály být nejzajímavější, a to kyselina octová, phenylethylacetát, phenylethanol a tyrosol. V Tab. 15 jsou uvedeny použité koncentrace jednotlivých látek.

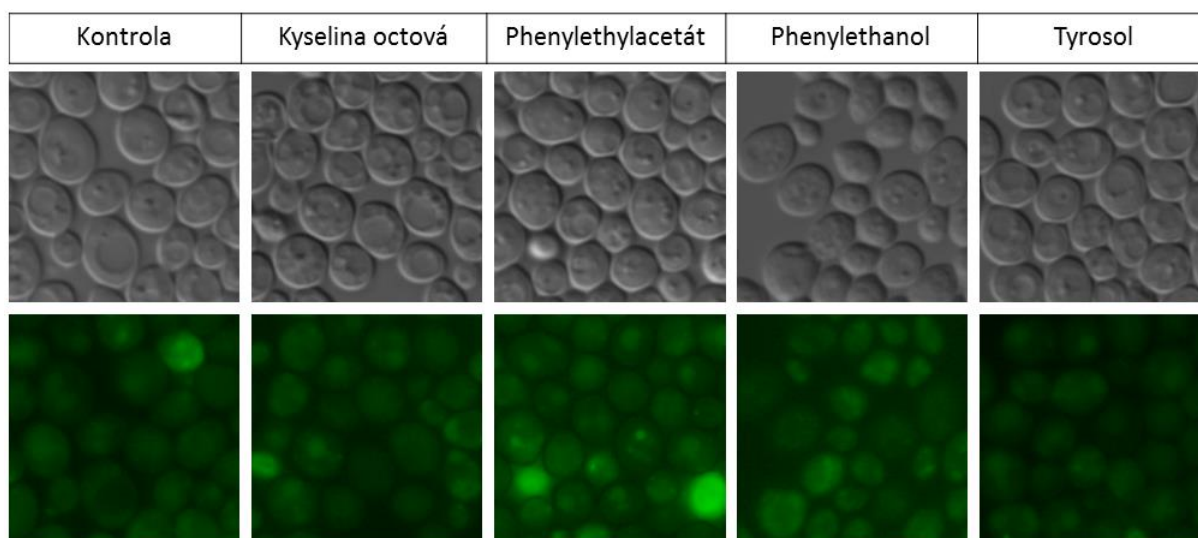
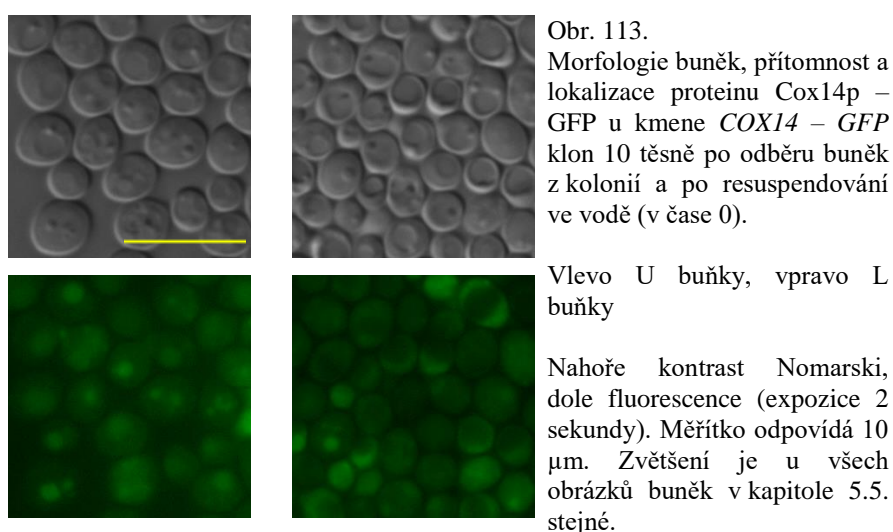
Vybrané látky pro koncentrační testy	
Kyselina octová	10 mM
Phenylethylacetát	20 mM
Phenylethanol	40 mM
Tyrosol	100 mM

Tab. 15. Použité koncentrace vybraných látek

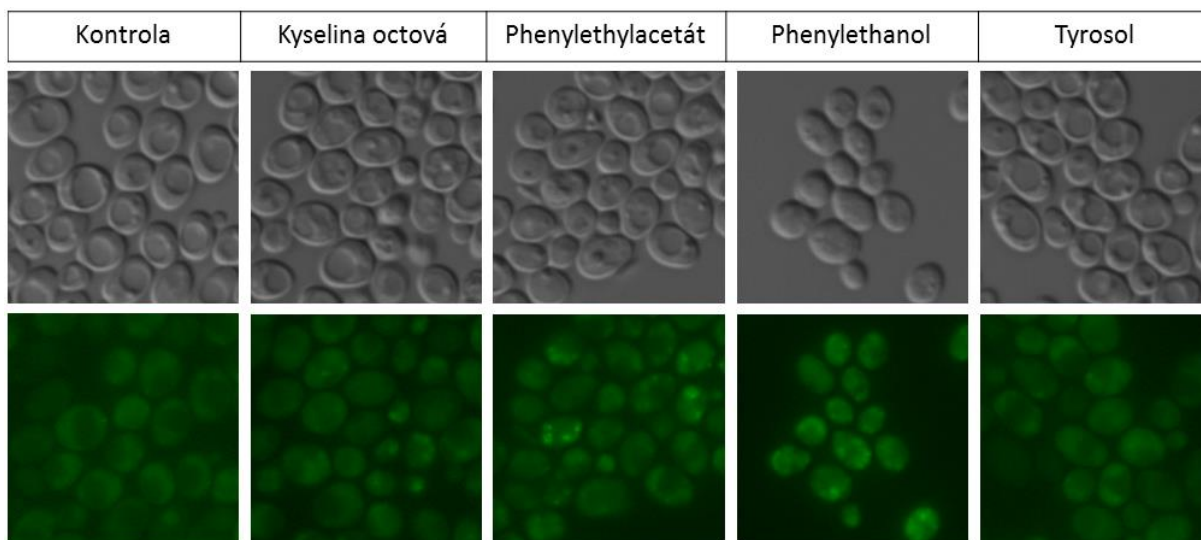
Na obrázcích 113 – 133 jsou uvedeny získané výsledky pro jednotlivé kmeny a proteiny.

### COX14 – GFP klon 10

Předchozí výsledky na vertikálních řezech koloniemi (viz kapitola 5.4.) ukázaly slabou produkci proteinu Cox14p – GFP v mitochondriích v U i L buňkách. Podobně je tomu tak i u kontrolních vzorků U a L buněk odebraných z kolonií v čase 0 (viz Obr. 113). Fluorescenční signál u některých U buněk je viditelný i ve vakuole, v čemž by mohla hrát roli autofagie. Z výsledků je patrné, že phenylethylacetát a phenylethanol mají vliv na zvýšenou produkci proteinu Cox14p – GFP u U i L buněk (oproti kontrole v čase 0 i po inkubaci ve vodě). Částečně je produkce viditelná i po působení kyseliny octové. U tyrosolu je produkce neprůkazná (viz Obr. 114 a 115).



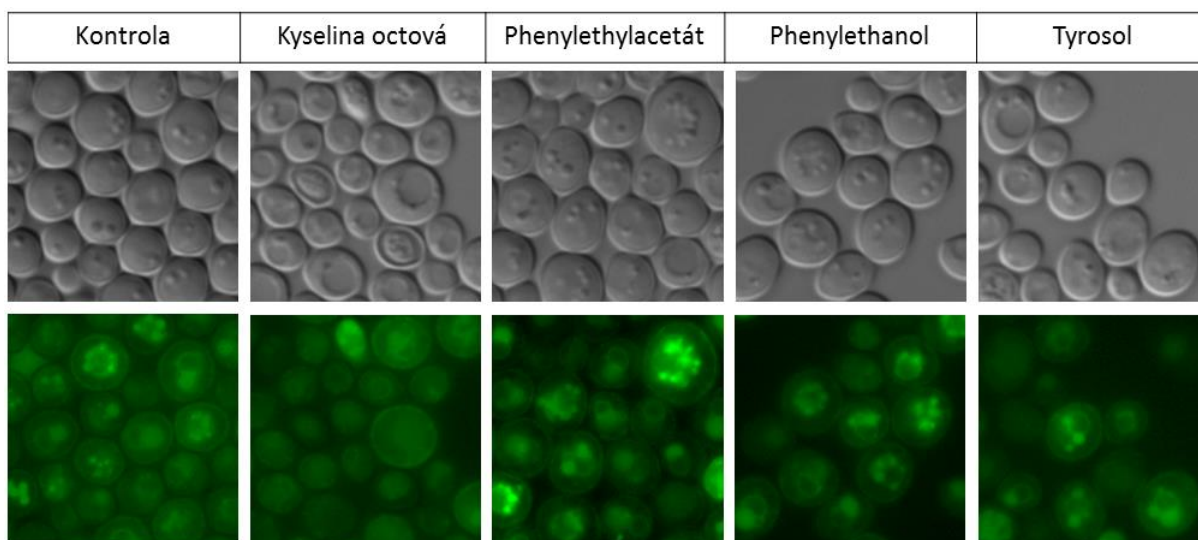
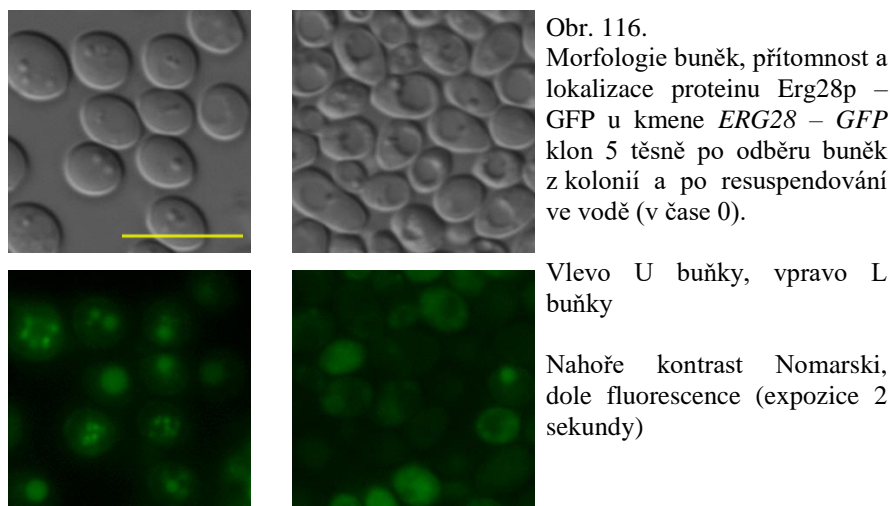
Obr. 114. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na U buňky kmene *COX14 – GFP* klon 10. Nahoře kontrast Nomarski, dole fluorescence (expozice 2 sekundy)



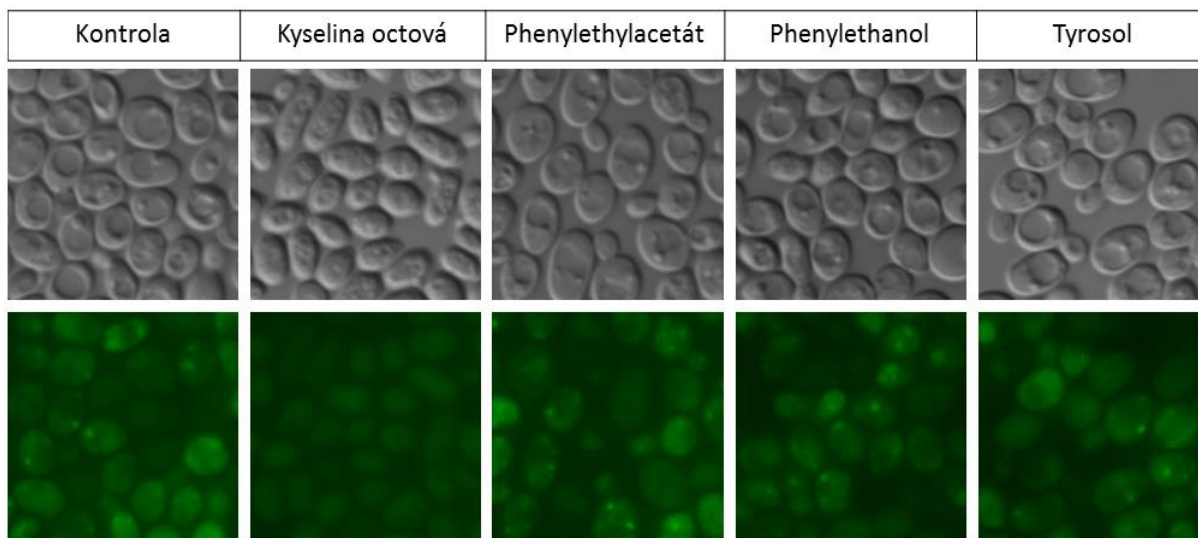
Obr. 115. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na L buňky kmene *COX14 – GFP* klon 10. Nahoře kontrast Nomarski, dole fluorescence (expoze 2 sekundy)

### ERG28 – GFP klon 5

Lokalizace proteinu Erg28p – GFP v endoplazmatickém retikulu, která byla patrná z předchozích výsledků vertikálních řezů kolonií, je viditelná i u odebraných kontrolních vzorků U a L buněk (viz Obr. 116). U buňky mají fluorescenční signál silnější než L buňky a v některých buňkách se fluorescence objevuje ve vakuole. Vliv na vyšší produkci proteinu mají dle výsledků phenylethylacetát a phenylethanol u U buněk oproti kontrolnímu vzorku inkubovanému ve vodě (viz Obr. 117). Slabší produkce proteinu u U buněk je viditelná po přidání tyrosolu, ale ne v přítomnosti kyseliny octové. Vliv látek na produkci Erg28p – GFP u L buněk je celkově nevýrazný. Částečně se dá prokázat vliv phenylethanolu a phenylethylacetátu. Vliv tyrosolu a kyseliny octové je minimální nebo žádný.



Obr. 117. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na U buňky kmene *ERG28 – GFP* klon 5. Nahoře kontrast Nomarski, dole fluorescence (expozice 2 sekundy)

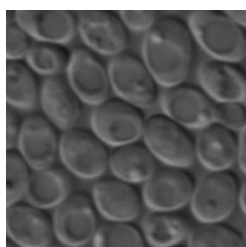
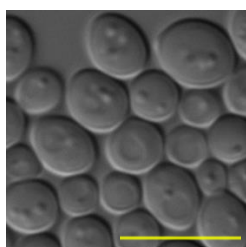


Obr. 118. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na L buňky kmene *ERG28 – GFP* klon 5. Nahoře kontrast Nomarski, dole fluorescence (expoze 2 sekundy)

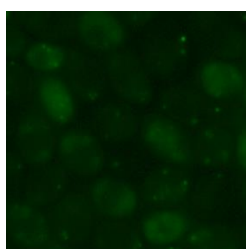
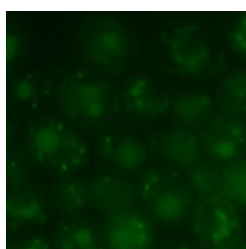


### MCXI – GFP klon 4

Produkce mitochondriálního proteinu Mcx1p – GFP je viditelná v kontrolách U i L buněk (viz Obr. 119). Všechny použité látky zvýší produkci proteinu u obou typů buněk (viz Obr. 120 a 121). Vyšší produkce se dá pozorovat u L buněk kultivovaných s phenylethanolem. Vliv působení této látky na produkci tohoto proteinu je nižší u U buněk než u L buněk. Podobný vliv na produkci je viditelný u vzorků s kyselinou octovou a phenylethylacetátem u U i L buněk. Naopak vliv tyrosolu je na produkci nepatrný. Kontrola U buněk se v produkci proteinu výrazně neliší. Oproti kontrole L buněk inkubovaných ve vodě je znatelnější nárůst produkce při kultivaci s phenylethanolem a částečně phenylethylacetátem.

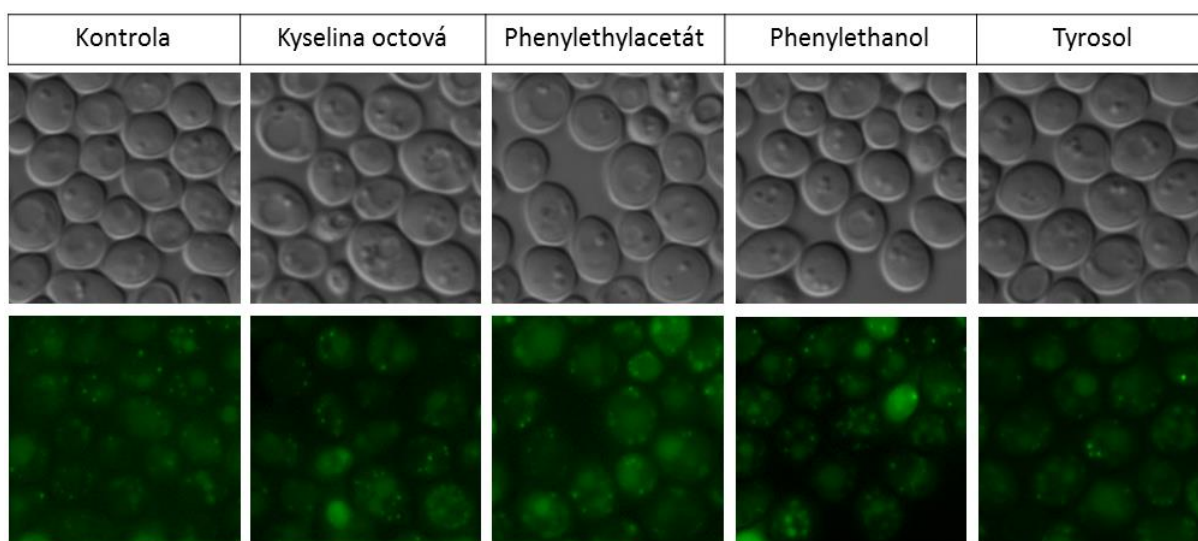


Obr. 119.  
Morfologie buněk, přítomnost a lokalizace proteinu Mcx1p – GFP u kmene *MCXI – GFP* klon 4 těsně po odběru buněk z kolonií a po resuspendování ve vodě (v čase 0).

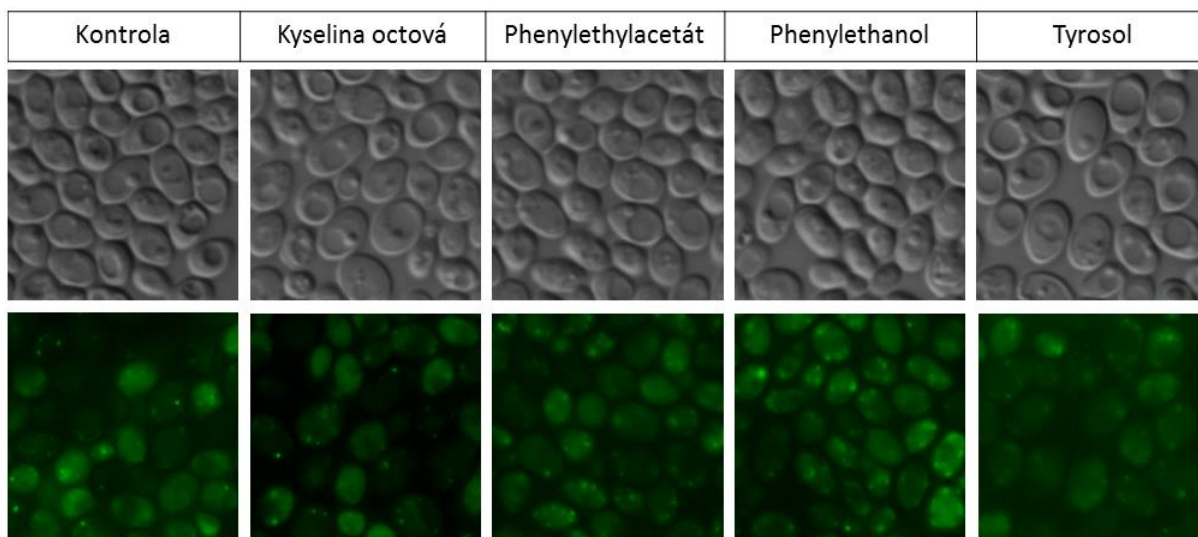


Vlevo U buňky, vpravo L buňky

Nahore kontrast Nomarski, dole fluorescence (expozice 2 sekundy)



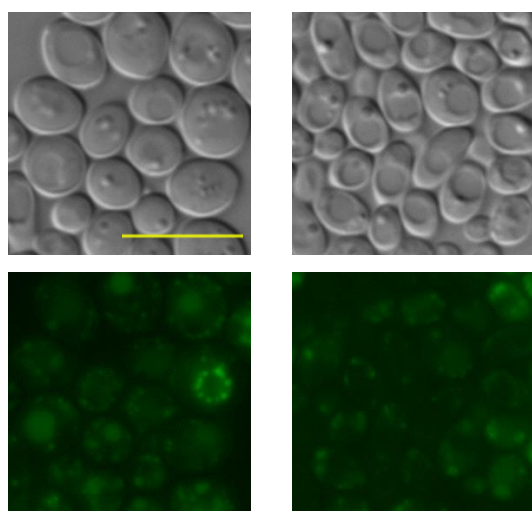
Obr. 120. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na U buňky kmene *MCXI – GFP* klon 4. Nahore kontrast Nomarski, dole fluorescence (expozice 2 sekundy)



Obr. 121. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na L buňky kmene *MCXI – GFP* klon 4. Nahore kontrast Nomarski, dole fluorescence (expozice 2 sekundy)

### RSM26 – GFP klon 3

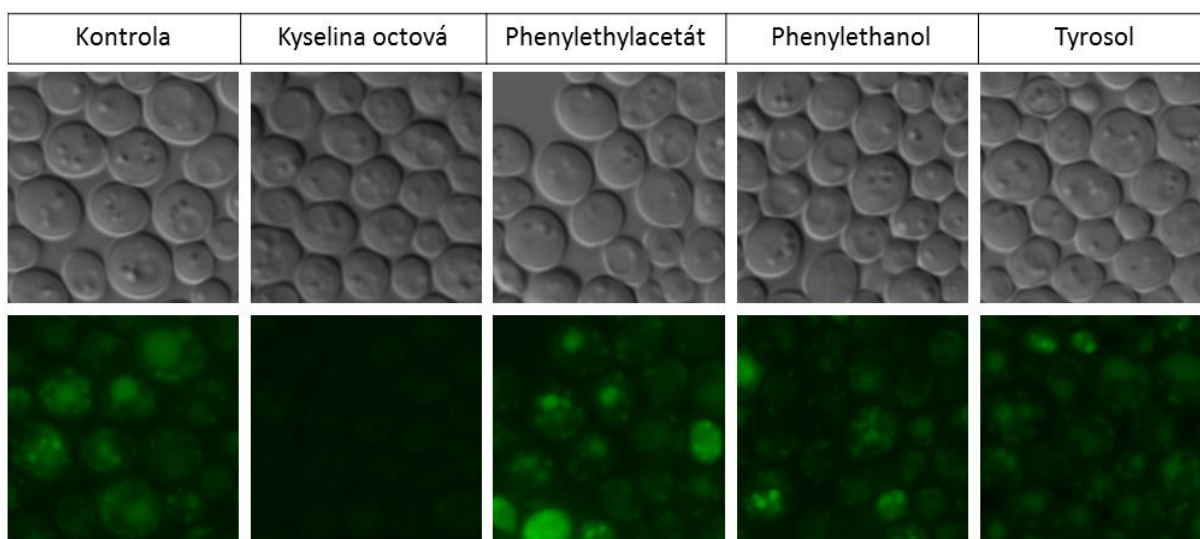
Lokalizace proteinu Rsm26p – GFP do mitochondrií je prokazatelná u kontrol U i L buněk. Některé U buňky mají fluorescenční signál i ve vakuole, což může souviset s mechanismem autofagie v buňce (viz Obr. 122). Změna produkce proteinu při kultivaci s látkami není oproti kontrolám příliš výrazná. U všech se produkce proteinu objevuje, ale ne ve vyšší míře. Viditelný je vliv kyseliny octové na U buňky, kde fluorescenční signál zcela vymizel a protein tedy není přítomný. Slabší signál než v kontrole inkubované ve vodě je možno vidět i v přítomnosti tyrosolu a phenylethanolu (viz Obr. 123). L buňky vykazují v přítomnosti kyseliny octové také slabší signál (viz Obr. 124).



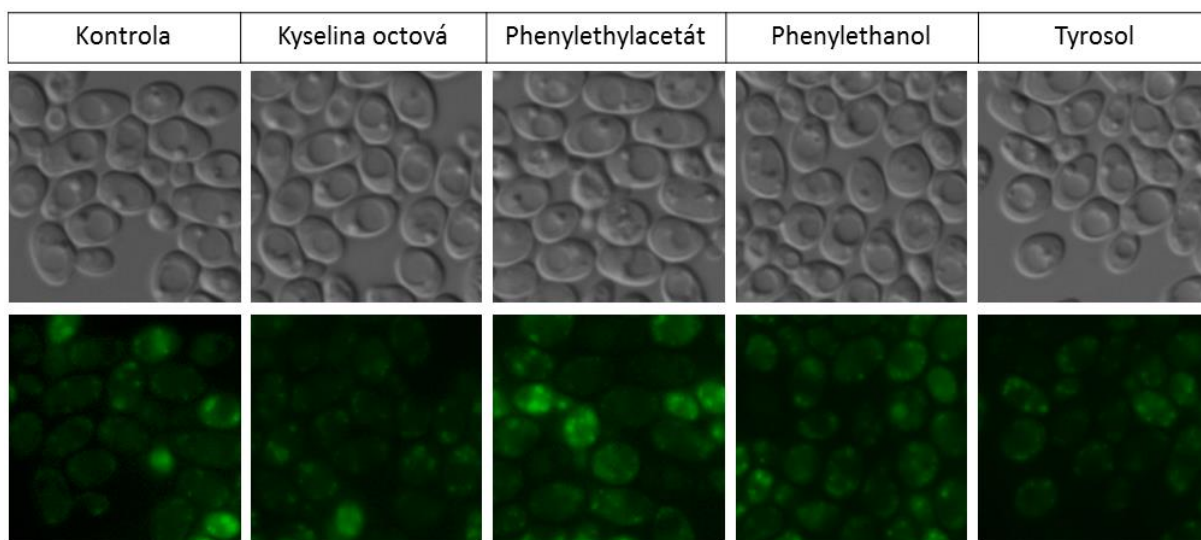
Obr. 122.  
Morfologie buněk, přítomnost a lokalizace proteinu Rsm26p – GFP u kmene *RSM26 – GFP* klon 3 těsně po odběru buněk z kolonií a po resuspendování ve vodě (v čase 0).

Vlevo U buňky, vpravo L buňky

Nahoře kontrast Nomarski, dole fluorescence (expozice 2 sekundy)



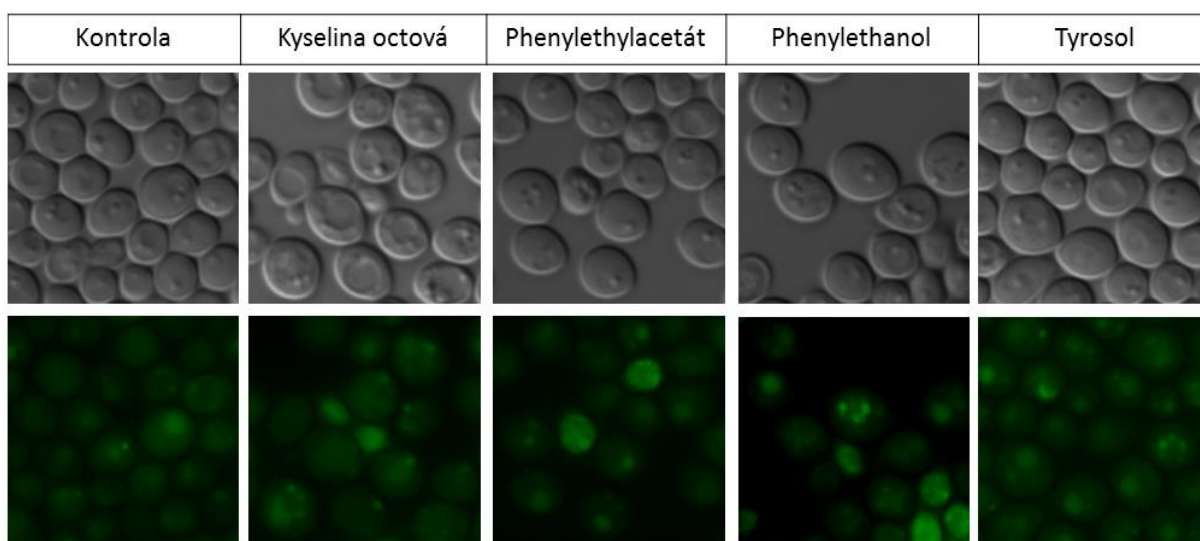
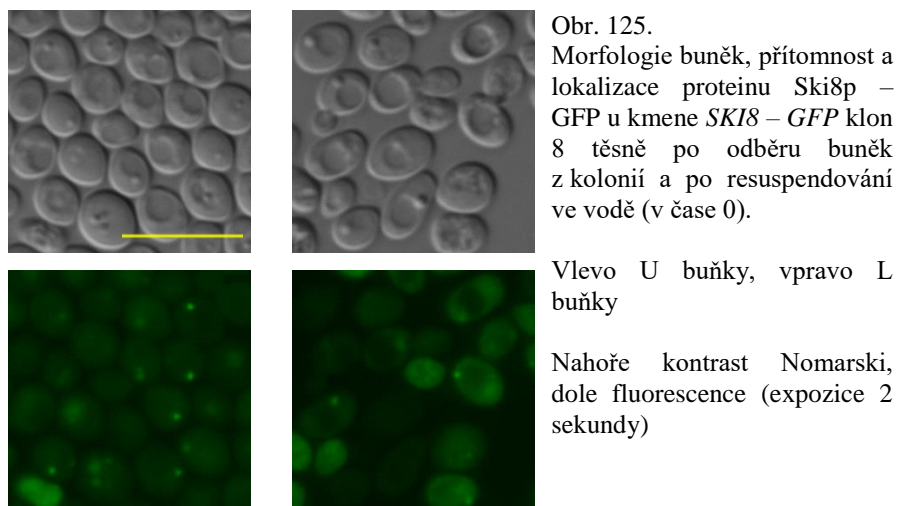
Obr. 123. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na U buňky kmene *RSM26 – GFP* klon 3. Nahoře kontrast Nomarski, dole fluorescence (expozice 2 sekundy)



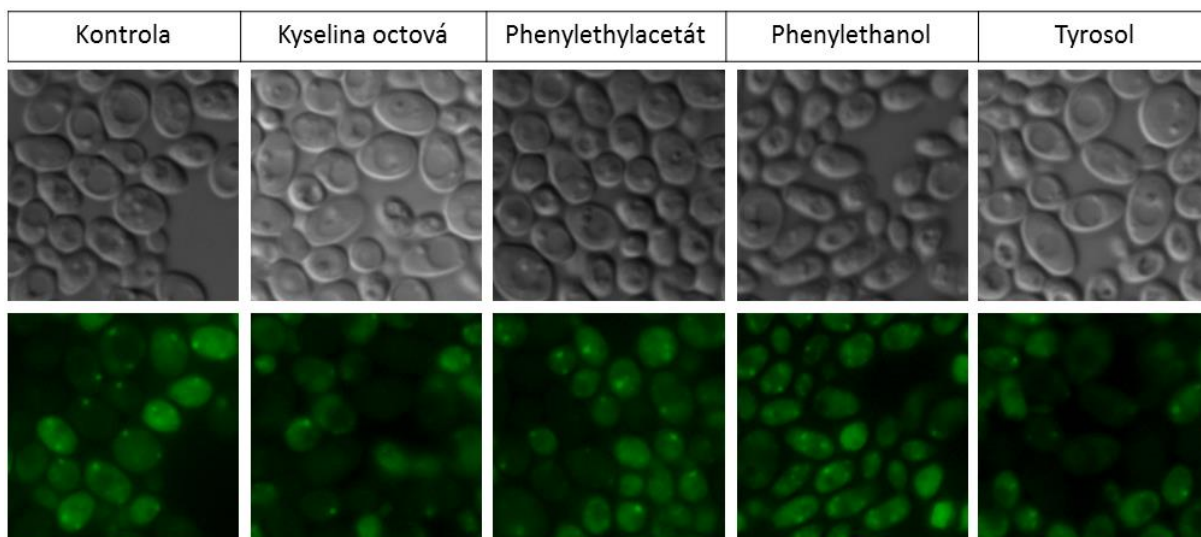
Obr. 124. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na L buňky kmene *RSM26 – GFP* klon 3. Nahore kontrast Nomarski, dole fluorescence (expoziční 2 sekundy)

### SKI8 – GFP klon 8

Cytoplazmatická lokalizace proteinu Ski8p – GFP je průkazná v kontrolních U i L buňkách v čase 0 (viz Obr. 125); v některých buňkách je protein přítomen v partikulích. Testované látky nemají vliv na produkci v U buňkách. U buňky mají často fluorescenční signál i ve vakuole, tudíž zde dochází k autofagii. Částečnou produkci proteinu vyvolá přítomnost kyseliny octové (viz Obr. 126). Vyšší produkce proteinu Ski8p – GFP oproti kontrole inkubované ve vodě je viditelná u L buněk. Z výsledků je patrné, že speciálně phenylethanol a phenylethylacetát mají vliv na vyšší produkci proteinu oproti kontrole a současně tyto látky poškodí morfologii těchto buněk. Je tedy viditelné, že se protein objevuje více v buňkách podléhajících stresu (viz Obr. 127).



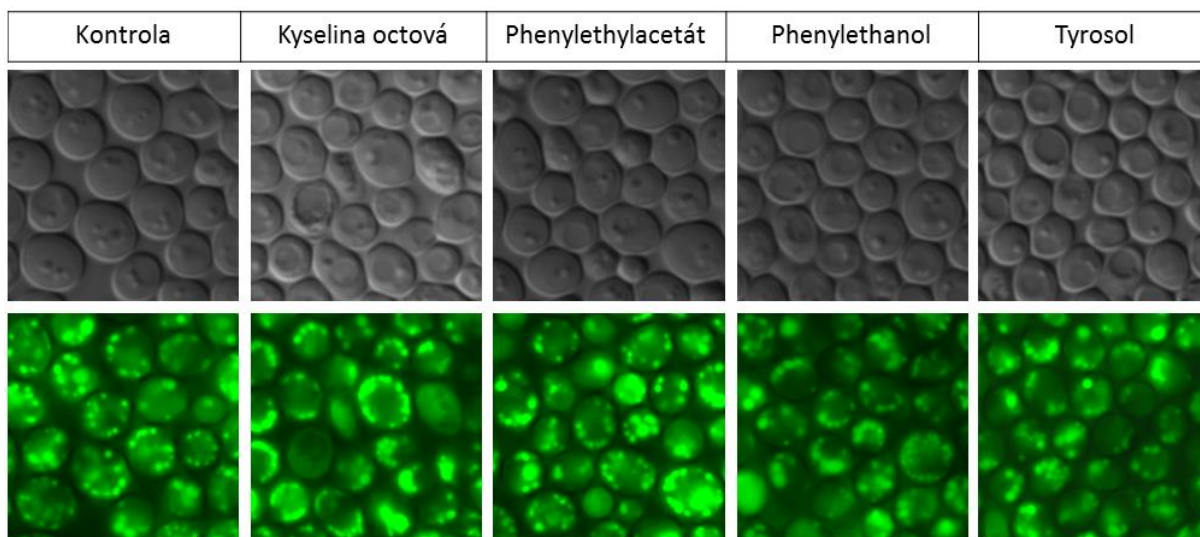
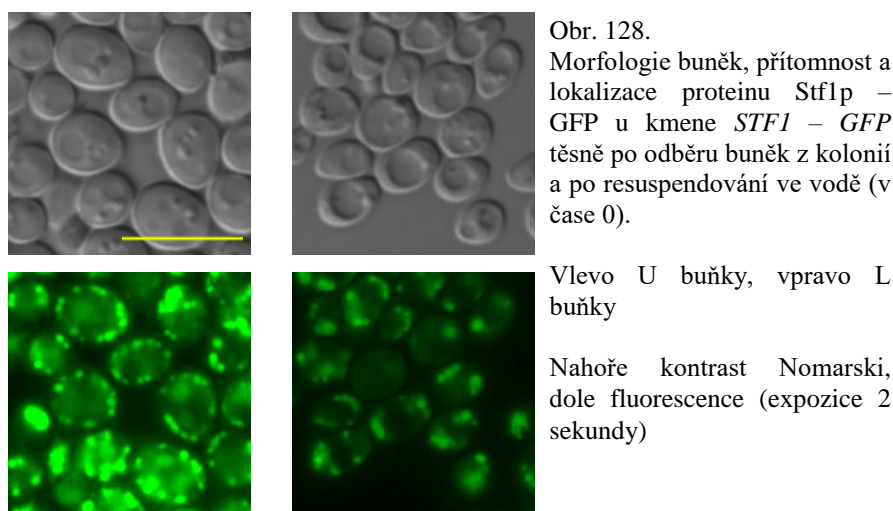
Obr. 126. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na U buňky kmene *SKI8 – GFP* klon 8. Nahore kontrast Nomarski, dole fluorescence (expozice 2 sekundy)



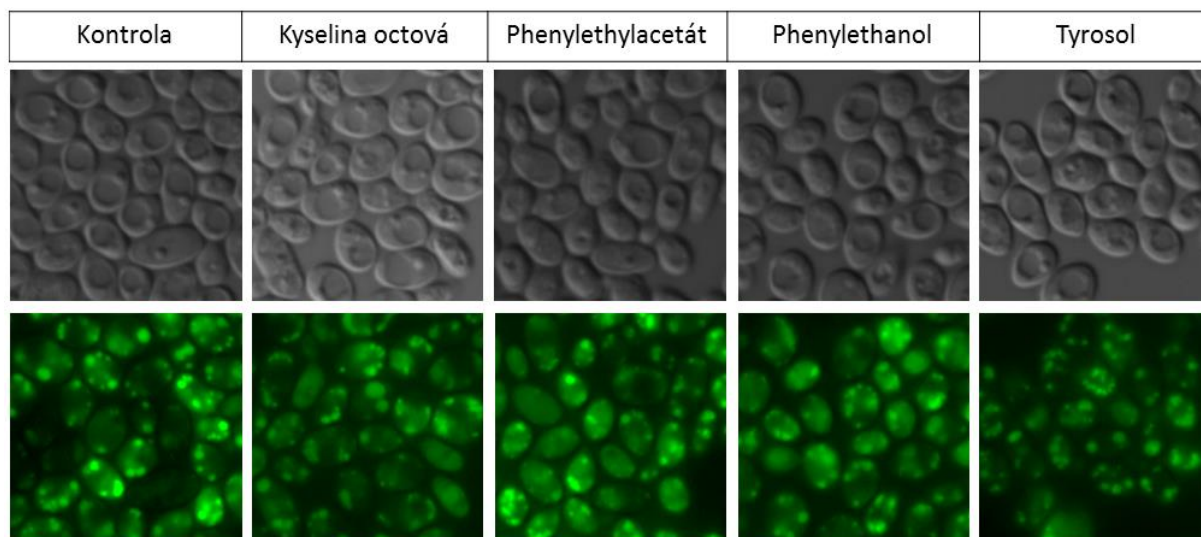
Obr. 127. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na L buňky kmene *SKI8 – GFP* klon 8. Nahore kontrast Nomarski, dole fluorescence (expoze 2 sekundy)

## STF1 – GFP

Mitochondriální lokalizace proteinu Stf1p – GFP byla ověřena pomocí kontrolních vzorků U i L buněk (viz Obr. 128). Na rozdíl od vertikálního řezu kolonií kmene *STF1 – GFP* (viz kapitola 5.4.) je signál v tomto experimentálním uspořádání jasnější a dá se na kontrolních buňkách určit vyšší produkce proteinu v U buňkách. Produkce proteinu v U buňkách není příliš ovlivněna působením jednotlivých látek. Pouze u phenylethanolu a tyrosolu se zdá být signál slabší, ale i přesto dobře viditelný (viz Obr. 129). Vliv látek na produkci proteinu v L buňkách je také nepatrný. L buňky mají slabší signál než U buňky, ale po kultivaci s látkami se signál výrazně neliší od kontroly ve vodě (viz Obr. 130).



Obr. 129. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na U buňky kmene *STF1 – GFP*. Nahoře kontrast Nomarski, dole fluorescence (expozice 2 sekundy)

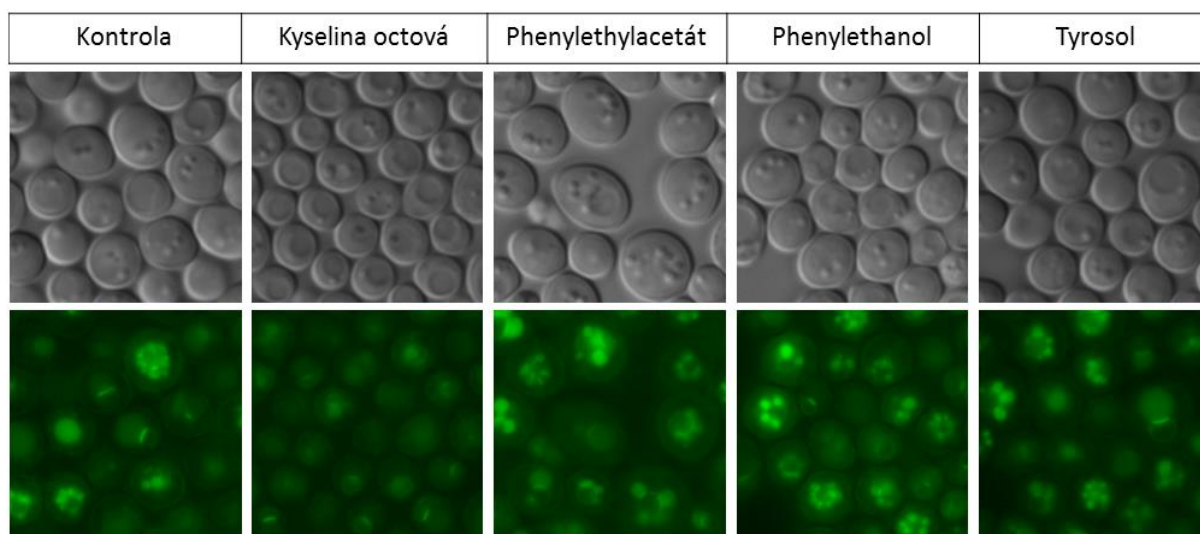
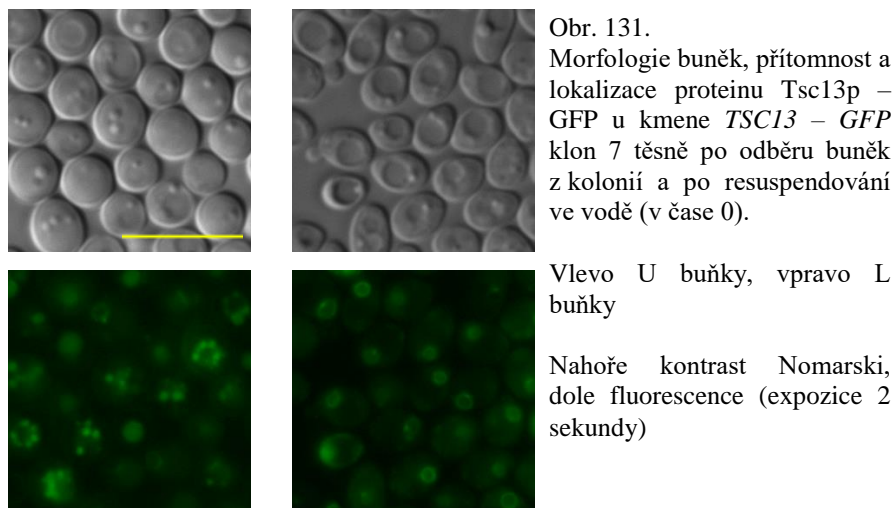


Obr. 130. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na L buňky kmene *STF1 – GFP*.  
Nahoře kontrast Nomarski, dole fluorescence (expoziční 2 sekundy)

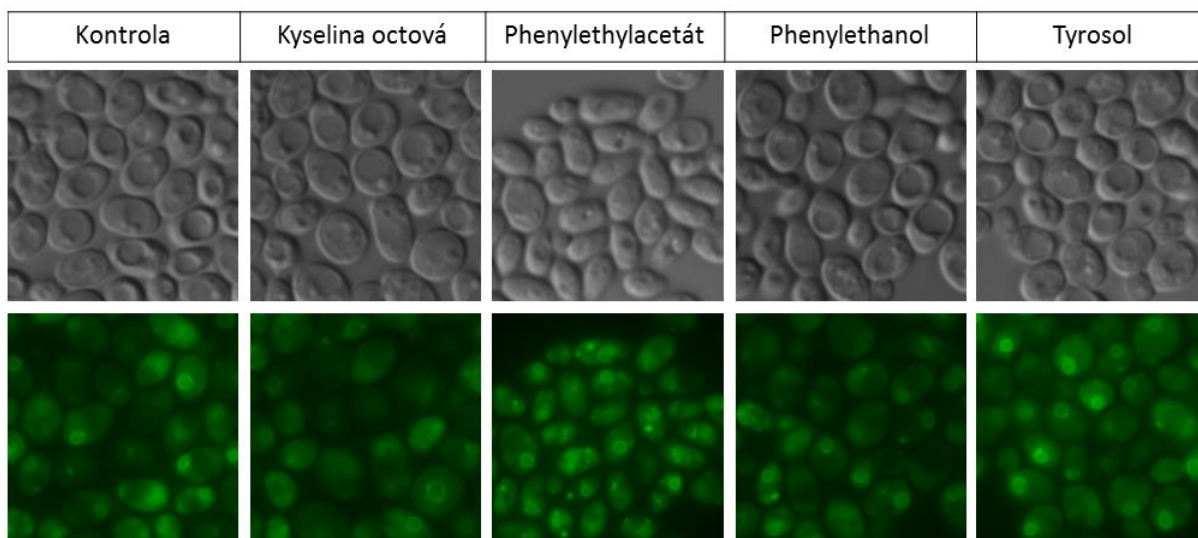


### TSC13 – GFP klon 7

Produkce proteinu endoplazmatického retikula Tsc13 – GFP je viditelná v kontrolách U i L buněk (viz Obr. 131). Fluorescenční signál je u obou typů buněk podobný. Po působení látek na U buňky signál navíc vykazuje jadernou a vakuolární lokalizaci, která je v kontrolách v čase 0 vidět velmi zřídka. Tato lokalizace je vidět při kultivaci s tyrosolem, kyselinou octovou a phenylethanolem. U phenylethylacetátu byla tato lokalizace méně viditelná, ale je zde dobře vidět lokalizace proteinu do endoplazmatického retikula. Oproti kontrole se snížil fluorescenční signál vyvolaný vlivem kyseliny octové a naopak je jasněji viditelný u phenylethanolu (viz Obr. 132.). Vliv na L buňky je podobný kontrole ve vodě. Vyšší produkce se zdá být pouze u phenylethylacetátu a tyrosolu. Vliv kyseliny octové na produkci je částečně i nižší než v kontrole ve vodě (viz Obr. 133).



Obr. 132. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na U buňky kmene *TSC13 – GFP* klon 7. Nahoře kontrast Nomarski, dole fluorescence (expozice 2 sekundy)



Obr. 133. Vliv vybraných látek (působení 1,5 hod) na L buňky kmene *TSC13 – GFP* klon 7.  
Nahoře kontrast Nomarski, dole fluorescence (expoze 2 sekundy)

## 6. Diskuze

Kvasinkový metabolismus zahrnuje řadu metabolických drah, které jsou nezbytné pro správný vývoj buněk a reakci na změny živin v jejich okolí. Dráhy se vzájemně ovlivňují, podporují nebo inhibují např. prostřednictvím svých metabolitů a různých intermediátů. Jednou z drah zkoumaných u *S. cerevisiae* je i Ehrlichova dráha, katabolická dráha aminokyselin, která vede ke vzniku odpadních alkoholů a kyselin (Ehrlich 1907), z nichž některé dodávají chuť např. vínu a mohou kvasinkám sloužit jako signální molekuly. V řadě prací byl popsán průběh vzniku těchto látek. Významné byly experimenty na tyrosinu, u jehož katabolismu byla dokázána první vzorová rovnice Ehrlichovy dráhy. V této dráze vzniká jako koncový odpadní produkt alkohol tyrosol (Sentheshanmuganathan and Elsdén 1958). Postupem času byla dráha popsána i pro další aminokyseliny a byla upravena do současné formy (viz Obr. 8). Koncové látky Ehrlichovy dráhy nejsou zbytečnými meziprodukty, a jak se ukázalo, mají nezaměnitelné využití v potravinářském průmyslu jako faktory chuti a vůně u alkoholických nápojů, potravin, kosmetiky apod (Etschmann, Bluemke et al. 2002). Kromě již zmíněného byl zkoumán i vliv některých odpadních látek Ehrlichovy dráhy na vlastnosti a vývoj kvasinek související s možnou funkcí těchto látek v roli signálních molekul. Bylo totiž zjištěno, že za určitých podmínek mají například vliv na přepínání z normálního růstu v podobě oválných buněk na růst pseudohyfální (Odds 1988, Dickinson 1996, Hornby, Jensen et al. 2001, Ramage, Saville et al. 2002, Chen, Fujita et al. 2004, Kern, Nunn et al. 2004). Hlavním cílem této práce bylo vybrat některé látky Ehrlichovy dráhy a určit jejich vliv na morfologii a vývoj kolonií kvasinek *S. cerevisiae* a na produkci vybraných proteinů.

### 6.1. Diferenciace kolonií *S. cerevisiae* a vliv látek na změnu morfologie buněk

Během růstu a vývoje obřích kolonií na pevném GM médiu dochází po zhruba 12 – 14 dnech k alkalizaci média, která je vyvolána produkcí plynného amoniaku. V této vývojové fázi kvasinkové kolonie diferencují na dva specializované typy buněk U a L. U buňky v horních vrstvách kolonie jsou větší, vitálnější a odolnější v porovnání s druhým typem L buněk, nacházejících se ve středních oblastech kolonie (Cap, Stepanek et al. 2012). Analýza látek Ehrlichovy dráhy, které U a L buňky po úplné diferenciaci kolonie produkují, ukázala, že množství vyprodukovaných látek je u U i L buněk rozdílné (Ing. Eva Ježková,

nepublikováno). Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak budou diferencované buňky odebrané z kolonií reagovat na vybrané produkty Ehrlichovy dráhy, které jsou v kolonii přirozeně přítomny. Ukázalo se, že zvláště vyšší koncentrace některých z těchto látek působí na buňky negativně, tedy látky se ve vyšších koncentracích a také s narůstající dobou působení se jeví jako stresory a svým vlivem mění morfologii obou typů buněk. Ve všech případech je vidět, že se morfologie L buněk při působení látek mění rychleji a výrazněji než u U buněk. L buňky pocházející z diferencované kolonie jsou tedy výrazně méně odolné v porovnání s U buňkami i k působení látek (látky způsobující v nejvyšších testovaných koncentracích největší změny morfologie L buněk oproti U buňkám již po 1 dni působení: phenylethanol, kyselina 2 – methylbutanová, kyselina izomáselná, kyselina izovalerová) podobně jako jsou citlivější k působení vyšší teploty, ethanolu a reaktivních kyslíkových druhů, jak bylo již dříve ukázáno (Cap, Stepanek et al. 2012).

Změny morfologie buněk byly popsány již dříve, např. po působení isoamylalkoholu, kdy došlo při růstu *S. cerevisiae* v tekutém YEPD médiu k přepnutí z buněk oválných na pseudohyfální (Dickinson 1996). Podobný vliv má i tyrosol u *C. albicans*, ten byl také jedním z vybraných látek této práce (Chen, Fujita et al. 2004). Tito autoři studovali vliv zmíněných látek na rostoucích kulturách kvasinek. V této diplomové práci byl studován vliv látek již na stárnoucích nerostoucích buňkách izolovaných z diferencovaných kolonií. Působení jednotlivých látek mohlo být proto prováděno pouze ve vodě, neboť bylo potřeba zamezit dalšímu vývoji jednotlivých izolovaných typů buněk. Pro přepnutí na pseudohyfální růst je nutná kultivace v živném médiu, která zde nemohla být použita a výsledky těchto autorů tak nemohly být ověřeny. Vliv na změnu morfologie buněk však měly všechny látky. Rozdíl mezi působením kyselin, alkoholů (a jejich derivátů) a dalších látek na morfologii buněk *S. cerevisiae* byl výrazný. Při nejvyšších testovaných koncentracích působily kyseliny a jejich deriváty jako největší stresory. Například méně odolné L buňky byly téměř mrtvé po 1 dni působení těchto látek, což se u alkoholů a dalších látek běžně nestávalo. Na základě rychlosti změny morfologie byly vybrány vhodné koncentrace látek pro studium jejich vlivu na množství a lokalizaci vybraných proteinů v diferencovaných koloniích v jednotlivých buňkách. Byly vybrány většinou vyšší koncentrace kyseliny octové, phenylethanolu, phenylethylacetátu a tyrosolu, které umožnily, zkrátit dobu inkubace, aby se dále omezila možnost změn U a L buněk vyvolaná pouhým odebráním těchto buněk ze struktury kolonie.

## 6.2. Lokalizace GFP označených proteinů a působení vybraných látek

Pro hlubší analýzu účinku studovaných vzorků je důležité zjistit, jaké další změny buněk vedle změn morfologie jednotlivé látky vyvolají. Jedním z možných přístupů je pokusit se zjistit, jak buňky na tyto látky reagují na úrovni produkce vybraných proteinů. Na základě proteomické analýzy vzorků U a L buněk po působení vybraných látek (Ing. Eva Ježková, nepublikováno) byly vybrány ty proteiny, které po působení látek zvyšují koncentraci nebo naopak při působení látek z buněk mizí. Dále ji diskutována lokalizace těchto proteinů v diferencované kolonii a vliv kyseliny octové, phenylethanolu, phenylethylacetátu a tyrosolu na produkci těchto proteinů v odebraných U a L buňkách.

Cox14p je mitochondriální protein, který by měl mít vliv na sestavení cytochrom oxidázy u kvasinek. Jedná se o transmembránový protein mitochondriálních membrán (Glerum, Koerner et al. 1995). Geny *COX* jsou většinou více exprimované v L buňkách a to např. i *COX1*, kódující katalytickou podjednotku cytochrom oxidázy, která je při svém sestavování regulována právě i proteinem Cox14p. Je to pravděpodobně dáno vyšší respirační aktivitou L buněk (Barrientos, Zambrano et al. 2004, Cap, Stepanek et al. 2012). Výsledky ukázaly, že phenylethanol a phenylethylacetát mají vliv na zvýšení produkce proteinu Cox14p částečně v U buňkách, ale více pak v L buňkách. Phenylethanol a phenylethylacetát tedy mohou hrát roli ve zvýšení produkce regulačního proteinu Cox14p a možná i aktivitě dalších *COX* genů.

Erg28p je lokalizován v membráně endoplazmatického retikula (Hughes, Marton et al. 2000). Protein funguje jako regulátor obsahující transmembránovou doménu, který zprostředkovává interakci mezi Erg26p (C – 3 sterol dehydrogenáza) a Erg27p (3 – keto sterol reduktáza), důležitou pro biosyntézu ergosterolu. Oba dva proteiny nemají transmembránovou doménu a sami by nemohly vytvořit fungující komplex (Gachotte, Eckstein et al. 2001). Produkce Erg28p je dle výsledků specifitější pro U buňky. Phenylethanol a phenylethylacetát jeho produkci v U buňkách zvyšují a mohly by proto hrát roli v regulaci biosyntézy ergosterolu. U buňky jsou odolnější buňky, mají vyšší metabolickou aktivitu, a zřejmě i aktivnější biosyntézu ergosterolu (Cap, Stepanek et al. 2012).

Mcx1p je mitochondriální protein lokalizovaný v mitochondriální matrix. Jedná se o mitochondriální chaperon (van Dyck, Dembowski et al. 1998). Produkce proteinu v buňkách

je nízká. Protein je přítomen přibližně ve stejném množství v U i L buňkách. Viditelná změna produkce je vidět až po působení phenylethanolu a částečně phenylethylacetátu u L buněk. U buňky vykazují také částečný nárůst produkce proteinu po působení těchto látek. Vzhledem k tomu, že se jedná o chaperon, tak je možné, že jeho aktivita stoupá se stresem v buňce. Mcx1p je homolog chaperonu ClpX (u *E. coli*), který je asociován se specifickými proteázami a hraje roli v degradaci špatně sbalených proteinů (van Dyck, Dembowski et al. 1998). Je tedy možné, že u zdravějších buněk je proteinu méně oproti buňkám s poškozenou morfologií a životaschopností.

Rsm26p tvoří část malé ribosomální podjednotky mitochondriálního ribosomu (Saveanu, Fromont-Racine et al. 2001). Hladina proteinu v mitochondriích je přibližně stejná v U i L buňkách. Během analýzy testovaných látek většinou nebyly pozorovány výrazné rozdíly v produkci Rsm26p. Jediný rozdíl v produkci proteinu byl zjištěn u U buněk v přítomnosti kyseliny octové, kdy fluorescenční signál úplně vymizel a u L buněk byl také výrazně snížen. Kyselina octová může fungovat jako buněčný stresor. Vzhledem k tomu, že je Rsm26p součástí mitochondriálních ribosomů, mohlo by při zvýšeném stresu docházet ke snížené translaci.

Ski8p je součástí cytoplazmatického SKI komplexu, který hraje roli v 3'→ 5' degradaci mRNA. Komplex tvoří exosom, který se zapojuje do degradace nepotřebné mRNA a poškozené mRNA (Anderson and Parker 1998, Madrona and Wilson 2004). SKI geny jsou známé také u killer kmenů kvasinek, kde regulují množství mRNA pro vznik toxinu. Bez jejich funkce dochází k tvorbě nestabilního superkiller fenotypu, který zatěžuje buňku. Jsou to tedy proteiny, které běžně reagují na stres v buňce (Wickner 1996). Protein je přítomen v obou typech buněk. Jeho produkce v L buňkách se zvyšuje po působení phenylethanolu a phenylethylacetátu. Zvýšená produkce Ski8p u L buněk by mohla být vyvolána stresem způsobených těmito látkami. V buňkách mohou existovat mRNA, které nejsou potřebné pro translaci. Mohou se objevovat i poškozené mRNA. L buňky mají samy o sobě hladinu stresu vyšší (Cap, Stepanek et al. 2012), a proto by mohly být ke stresu citlivější a hladina Ski8p by se tedy při stresu u těchto buněk mohla zvyšovat.

Tsc13p je enoyl – reductáza vyskytující se v endoplazmatickém retikulu. Katalyzuje poslední krok elongace mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Protein může kromě do endoplazmatického retikula lokalizovat také v místech interakce jaderného a vakuolárního

obalu (Severs, Jordan et al. 1976, Pan, Roberts et al. 2000, Kohlwein, Eder et al. 2001). Protein je přítomen v podobném množství v U i L buňkách. Působení phenylethanolem, phenylethylacetátem a tyrosolem způsobuje vyšší produkci proteinu u U buněk. Vliv phenylethanolu a tyrosolu navíc vyvolává zvýšení množství proteinu v oblasti jaderné a vakuolární interakce. Produkce proteinu u L buněk se působením phenylethylacetátu a tyrosolu rovněž zvyšuje. Exprese genu *TSC13* se zvyšuje při DNA stresu (Tkach, Yimit et al. 2012) a jako v některých předchozích případech nelze vyloučit, že působení látek DNA stres nevyvolává. Zajímavé je, že kyselina octová na rozdíl od ostatních látek produkci proteinu nezvyšuje.

Stf1p je jeden ze stabilizačních faktorů inhibitoru Inh1p. Stabilizační faktory Stf1p a Stf2p podporují funkci tohoto inhibitoru. Inh1p zabraňuje nepotřebné hydrolýze ATP u mitochondriální F1F0 ATPázy. Při syntéze ATP komplex Inh1p se stabilizačními faktory Stf1p a Stf2p ATPázu neovlivňuje, jakmile by ovšem došlo k opačnému stavu (hydrolýza ATP), tak komplex začne hydrolýzu inhibovat (Ichikawa, Yoshida et al. 1990, Dienhart, Pfeiffer et al. 2002). Produkce proteinu je silnější u U buněk. Vzhledem k tomu, že U buňky mají méně vyvinuté mitochondrie, také méně efektivně respirují, což by mohlo vést k opačnému efektu funkce F1F0 ATPázy a tedy k hydrolýze ATP. Stf1p jako stabilizátor inhibitoru hydrolýzy ATP by pak mohl být v buňce více potřeba a jeho produkce by mohla být větší. Komplex s inhibitorem neovlivňuje oxidativní fosforylaci, která může efektivněji probíhat u normálních mitochondrií L buněk (Dienhart, Pfeiffer et al. 2002, Cap, Stepanek et al. 2012). Výrazný vliv testovaných látek na změnu produkce proteinu Stf1p však nebyl pozorován.

Tato práce je první studií efektu vybraných látek Ehrlichovy dráhy na diferencované buňky kvasinkových kolonií. Látky Ehrlichovy dráhy mají na vývoj a diferenciaci kolonií zjevně vliv, ale bude nutné provést další podrobnější studie jejich působení, např. na buňky odebrané z různě starých kolonií. Je známo, že produkty Ehrlichovy dráhy mohou fungovat jako signální molekuly, např. v pseudohyphálním růstu, který je indukován isoamylalkoholem (Dickinson 1996). Jako nejslibnější kandidáty potenciálně zapojené v signalizaci související s vývojem kolonií *S. cerevisiae* bych vzhledem k výsledkům této práce vybral phenylethanol a phenylethylacetát. Je nicméně zatím těžké odhadnout, zda látky působí více jako stresory, kterým se buňka brání, nebo hrají roli právě v signalizaci spouštějící genovou expresi. Studie vlivu těchto látek nicméně mohou pomoci pochopit rozdíly mezi U a L buňkami kolonií *S.*

*cerevisiae* a to díky odlišnému vlivu na morfologii U a L buněk, odolnosti těchto buněk a nalezení dalších genů specifických pro U nebo L buňky.



## 7. Souhrn

V rámci diplomové práce byly získány tyto výsledky:

- Byl zpracován přehled literatury s informacemi o diferenciaci kolonií *S. cerevisiae*, aktuálními poznatky o látkách Ehrlichovy dráhy a jejich známými vlivy na kvasinky.
- Byl charakterizován vliv látek Ehrlichovy dráhy na změnu morfologie U a L buněk kolonie *S. cerevisiae* a vzájemně porovnána odolnost U a L buněk.
- Z testovaných látek Ehrlichovy dráhy se podařilo vybrat 4 nejzajímavější látky (phenylethanol, phenylethylacetát, kyselina octová a tyrosol) a jejich koncentraci vhodnou pro testování vlivu těchto látek na kvasinkové buňky.
- Bylo zkonstruováno 6 kmenů odvozených od laboratorního kmene BY4742 produkujících fúzní GFP proteiny, a to kmeny – *COX14 – GFP*, *ERG28 – GFP*, *MCX1 – GFP*, *RSM26 – GFP*, *SKI8 – GFP*, *TSC13 – GFP*.
- Byl charakterizován vývoj, morfologie a diferenciaci na U a L buňky kolonií zkonstruovaných kmenů pomocí vertikálních řezů.
- Pomocí fluorescenční mikroskopie byla ověřena produkce příslušných proteinů v U a L buňkách kolonií zkonstruovaných kmenů.
- Pomocí fluorescenční mikroskopie a mikroskopie s Nomarski kontrastem byl charakterizován vliv 4 vybraných látek na U a L buňky zkonstruovaných kmenů. Tato charakterizace zahrnovala pozorování změn morfologie buněk a vliv na změnu produkce proteinů označených GFP u U a L buněk.

## 8. Seznam použité literatury

- Allen, C., S. Buttner, A. D. Aragon, J. A. Thomas, O. Meirelles, J. E. Jaetao, D. Benn, S. W. Ruby, M. Veenhuis, F. Madeo and M. Werner-Washburne (2006). "Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures." J Cell Biol **174**(1): 89-100.
- Anderson, J. J. and S. Dagley (1981). "Catabolism of tryptophan, anthranilate, and 2,3-dihydroxybenzoate in *Trichosporon cutaneum*." Journal of Bacteriology **146**(1): 291-297.
- Anderson, J. S. and R. P. Parker (1998). "The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex." Embo j **17**(5): 1497-1506.
- Arguello, J. R., C. Sellanes, Y. R. Lou and R. A. Raguso (2013). "Can yeast (*S. cerevisiae*) metabolic volatiles provide polymorphic signaling?" PLoS One **8**(8): e70219.
- Arismendi-Morillo, G. J. and A. V. Castellano-Ramirez (2008). "Ultrastructural mitochondrial pathology in human astrocytic tumors: potentials implications pro-therapeutics strategies." J Electron Microsc (Tokyo) **57**(1): 33-39.
- Bais, H. P., S.-W. Park, T. L. Weir, R. M. Callaway and J. M. Vivanco (2004). "How plants communicate using the underground information superhighway." Trends in Plant Science **9**(1): 26-32.
- Barrientos, A., A. Zambrano and A. Tzagoloff (2004). "Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*." Embo j **23**(17): 3472-3482.
- Boer, V. M., S. L. Tai, Z. Vuralhan, Y. Arifin, M. C. Walsh, M. D. W. Piper, J. H. De Winde, J. T. Pronk and J.-M. Daran (2007). "Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures." FEMS Yeast Research **7**(4): 604-620.
- Botstein, D. and G. R. Fink (1988). "Yeast: an experimental organism for modern biology." Science **240**(4858): 1439-1443.
- Braun, P. C. and R. A. Calderone (1978). "Chitin Synthesis in *Candida albicans*: Comparison of Yeast and Hyphal Forms." J Bacteriol **133**(3): 1472-1477.
- Cap, M., L. Stepanek, K. Harant, L. Vachova and Z. Palkova (2012). "Cell differentiation within a yeast colony: metabolic and regulatory parallels with a tumor-affected organism." Mol Cell **46**(4): 436-448.

- Casperson, G. F., N. Walker, A. R. Brasier and H. R. Bourne (1983). "A guanine nucleotide-sensitive adenylate cyclase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Biological Chemistry **258**(13): 7911-7914.
- Cavalieri, D., J. P. Townsend and D. L. Hartl (2000). "Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 12369-12374.
- Crauwels, M., M. C. V. Donaton, M. B. Pernambuco, J. Winderickx, J. H. de Winde and J. M. Thevelein (1997). "The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway." Microbiology **143**(8): 2627-2637.
- De Virgilio, C. and R. Loewith (2006). "The TOR signalling network from yeast to man." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **38**(9): 1476-1481.
- Dickinson, J. R. (1996). "Fusel alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts." Microbiology **142**(6): 1391-1397.
- Dickinson, J. R., S. J. Harrison, J. A. Dickinson and M. J. E. Hewlins (2000). "An Investigation of the Metabolism of Isoleucine to Active Amyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Biological Chemistry **275**(15): 10937-10942.
- Dickinson, J. R., M. M. Lanterman, D. J. Danner, B. M. Pearson, P. Sanz, S. J. Harrison and M. J. E. Hewlins (1997). "A <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Investigation of the Metabolism of Leucine to Isoamyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Biological Chemistry **272**(43): 26871-26878.
- Dickinson, J. R., L. E. J. Salgado and M. J. E. Hewlins (2003). "The Catabolism of Amino Acids to Long Chain and Complex Alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Biological Chemistry **278**(10): 8028-8034.
- Dienhart, M., K. Pfeiffer, H. Schägger and R. A. Stuart (2002). "Formation of the Yeast F1F0-ATP Synthase Dimeric Complex Does Not Require the ATPase Inhibitor Protein, Inh1." Journal of Biological Chemistry **277**(42): 39289-39295.
- Duenas-Sanchez, R., A. G. Perez, A. C. Codon, T. Benitez and A. M. Rincon (2014). "Overproduction of 2-phenylethanol by industrial yeasts to improve organoleptic properties of bakers' products." Int J Food Microbiol **180**: 7-12.
- Ehrlich, F. (1907). "Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe." Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **40**(1): 1027-1047.
- Etschmann, M. M., W. Bluemke, D. Sell and J. Schrader (2002). "Biotechnological production of 2-phenylethanol." Appl Microbiol Biotechnol **59**(1): 1-8.
- Fukuda, K., M. Watanabe, K. Asano, K. Ouchi and S. Takasawa (1991). "A mutated ARO4 gene for feedback-resistant DAHP synthase which causes both o-fluoro-DL-

- phenylalanine resistance and beta-phenethyl-alcohol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet **20**(6): 453-456.
- Gachotte, D., J. Eckstein, R. Barbuch, T. Hughes, C. Roberts and M. Bard (2001). "A novel gene conserved from yeast to humans is involved in sterol biosynthesis." Journal of Lipid Research **42**(1): 150-154.
- Gancedo, J. M. (1998). "Yeast Carbon Catabolite Repression." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 334-361.
- Gietz, R. D., R. H. Schiestl, A. R. Willems and R. A. Woods (1995). "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure." Yeast **11**(4): 355-360.
- Gilbert, D. (1980). "Dispersal of yeasts and bacteria by *Drosophila* in a temperate forest." Oecologia **46**(1): 135-137.
- Giovannini, C., E. Straface, D. Modesti, E. Coni and et al. (1999). "Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells." The Journal of Nutrition **129**(7): 1269-1277.
- Glerum, D. M., T. J. Koerner and A. Tzagoloff (1995). "Cloning and Characterization of COX14, Whose Product Is Required for Assembly of Yeast Cytochrome Oxidase." Journal of Biological Chemistry **270**(26): 15585-15590.
- Gori, K., H. D. Mortensen, N. Arneborg and L. Jespersen (2007). "Ammonia production and its possible role as a mediator of communication for *Debaryomyces hansenii* and other cheese-relevant yeast species." J Dairy Sci **90**(11): 5032-5041.
- Gustin, M. C., J. Albertyn, M. Alexander and K. Davenport (1998). "MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1264-1300.
- Hartwell, L. H. (1980). "Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* unresponsive to cell division control by polypeptide mating hormone." J Cell Biol **85**(3): 811-822.
- Hazelwood, L. A., J. M. Daran, A. J. van Maris, J. T. Pronk and J. R. Dickinson (2008). "The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism." Appl Environ Microbiol **74**(8): 2259-2266.
- Hinnebusch, A. G. (2005). "TRANSLATIONAL REGULATION OF GCN4 AND THE GENERAL AMINO ACID CONTROL OF YEAST." Annual Review of Microbiology **59**(1): 407-450.
- Hornby, J. M., E. C. Jensen, A. D. Lisee, J. J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, P. Dussault and K. W. Nickerson (2001). "Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol." Applied and Environmental Microbiology **67**(7): 2982-2992.
- Hughes, T. R., M. J. Marton, A. R. Jones, C. J. Roberts, R. Stoughton, C. D. Armour, H. A. Bennett, E. Coffey, H. Dai, Y. D. He, M. J. Kidd, A. M. King, M. R. Meyer, D. Slade,

- P. Y. Lum, S. B. Stepaniants, D. D. Shoemaker, D. Gachotte, K. Chakraborty, J. Simon, M. Bard and S. H. Friend (2000). "Functional Discovery via a Compendium of Expression Profiles." Cell **102**(1): 109-126.
- Chang, Y.-Y., G. Juhász, P. Goraksha-Hicks, Andrew M. Arsham, Daniel R. Mallin, Laura K. Muller and Thomas P. Neufeld (2009). "Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway." Biochemical Society Transactions **37**(1): 232-236.
- Chen, H., M. Fujita, Q. Feng, J. Clardy and G. R. Fink (2004). "Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(14): 5048-5052.
- Ichikawa, N., Y. Yoshida, T. Hashimoto, N. Ogasawara, H. Yoshikawa, F. Imamoto and K. Tagawa (1990). "Activation of ATP hydrolysis by an uncoupler in mutant mitochondria lacking an intrinsic ATPase inhibitor in yeast." J Biol Chem **265**(11): 6274-6278.
- Inoki, K., H. Ouyang, Y. Li and K.-L. Guan (2005). "Signaling by Target of Rapamycin Proteins in Cell Growth Control." Microbiology and Molecular Biology Reviews **69**(1): 79-100.
- Jiang, R. and M. Carlson (1996). "Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex." Genes & Development **10**(24): 3105-3115.
- Jorgensen, P., I. Rupeš, J. R. Sharom, L. Schneper, J. R. Broach and M. Tyers (2004). "A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size." Genes Dev **18**(20): 2491-2505.
- Kaffman, A., N. M. Rank, E. M. O'Neill, L. S. Huang and E. K. O'Shea (1998). "The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus." Nature **396**(6710): 482-486.
- Kern, K., C. D. Nunn, A. Pichova and J. R. Dickinson (2004). "Isoamyl alcohol-induced morphological change in *Saccharomyces cerevisiae* involves increases in mitochondria and cell wall chitin content." FEMS Yeast Res **5**(1): 43-49.
- Kohlwein, S. D., S. Eder, C.-S. Oh, C. E. Martin, K. Gable, D. Bacikova and T. Dunn (2001). "Tsc13p Is Required for Fatty Acid Elongation and Localizes to a Novel Structure at the Nuclear-Vacuolar Interface in *Saccharomyces cerevisiae*." Molecular and Cellular Biology **21**(1): 109-125.
- Kuthan, M., F. Devaux, B. Janderova, I. Slaninova, C. Jacq and Z. Palkova (2003). "Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology." Mol Microbiol **47**(3): 745-754.
- Large, P. J. (1986). "Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts." Yeast **2**(1): 1-34.
- Liu, Z. and R. A. Butow (2006). "Mitochondrial Retrograde Signaling." Annual Review of Genetics **40**(1): 159-185.

- Madrona, A. Y. and D. K. Wilson (2004). "The structure of Ski8p, a protein regulating mRNA degradation: Implications for WD protein structure." Protein Science **13**(6): 1557-1565.
- Machida, K., T. Tanaka, Y. Yano, S. Otani and M. Taniguchi (1999). "Farnesol-induced growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* by a cell cycle mechanism." Microbiology **145**(2): 293-299.
- Odds, F. C. (1988). "Candida and candidosis: a review and bibliography. 2nd edition. ."
- Ogawa, N. (2000). "New Components of a System for Phosphate Accumulation and." **11**(12): 4309-4321.
- Ogawa, N., K. Noguchi, H. Sawai, Y. Yamashita, C. Yompakdee and Y. Oshima (1995). "Functional domains of Pho81p, an inhibitor of Pho85p protein kinase, in the transduction pathway of Pi signals in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **15**(2): 997-1004.
- Ortiz-Castro, R., H. A. Contreras-Cornejo, L. Macías-Rodríguez and J. López-Bucio (2009). "The role of microbial signals in plant growth and development." Plant Signal Behav **4**(8): 701-712.
- Owen, R. W., A. Giacosa, W. E. Hull, R. Haubner, B. Spiegelhalder and H. Bartsch (2000). "The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil." European Journal of Cancer **36**(10): 1235-1247.
- Palkova, Z. (2004). "Multicellular microorganisms: laboratory versus nature." EMBO Rep **5**(5): 470-476.
- Palkova, Z., F. Devaux, M. Icíková, L. Minariková, S. Le Crom and C. Jacq (2002). "Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development." Mol Biol Cell **13**(11): 3901-3914.
- Palkova, Z. and J. Forstova (2000). "Yeast colonies synchronise their growth and development." Journal of Cell Science **113**(11): 1923-1928.
- Palkova, Z., B. Janderova, J. Gabriel, B. Zikanova, M. Pospisek and J. Forstova (1997). "Ammonia mediates communication between yeast colonies." Nature **390**(6659): 532-536.
- Palkova, Z. and L. Vachova (2006). "Life within a community: benefit to yeast long-term survival." FEMS Microbiol Rev **30**(5): 806-824.
- Palkova, Z., D. Wilkinson and L. Vachova (2014). "Aging and differentiation in yeast populations: elders with different properties and functions." FEMS Yeast Res **14**(1): 96-108.
- Pan, X., P. Roberts, Y. Chen, E. Kvam, N. Shulga, K. Huang, S. Lemmon and D. S. Goldfarb (2000). "Nucleus–Vacuole Junctions in *Saccharomyces cerevisiae* Are Formed Through the Direct Interaction of Vac8p with Nvj1p." Molecular Biology of the Cell **11**(7): 2445-2457.

- Peddie, H. A. B. (1990). "ESTER FORMATION IN BREWERY FERMENTATIONS." Journal of the Institute of Brewing **96**(5): 327-331.
- Quilter, M. G., J. C. Hurley, F. J. Lynch and M. G. Murphy (2003). "The Production of Isoamyl Acetate from Amyl Alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of the Institute of Brewing **109**(1): 34-40.
- Ramage, G., S. P. Saville, B. L. Wickes and J. L. López-Ribot (2002). "Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule." Applied and Environmental Microbiology **68**(11): 5459-5463.
- Reuter, M., G. Bell and D. Greig (2007). "Increased outbreeding in yeast in response to dispersal by an insect vector." Current Biology **17**(3): R81-R83.
- Salucci, S., S. Burattini, M. Battistelli, F. Buontempo, B. Canonico, A. M. Martelli, S. Papa and E. Falcieri (2015). "Tyrosol prevents apoptosis in irradiated keratinocytes." Journal of Dermatological Science **80**(1): 61-68.
- Saveanu, C., M. Fromont-Racine, A. Harington, F. Ricard, A. Namane and A. Jacquier (2001). "Identification of 12 New Yeast Mitochondrial Ribosomal Proteins Including 6 That Have No Prokaryotic Homologues." Journal of Biological Chemistry **276**(19): 15861-15867.
- Sentheshanmuganathan, S. (1960). "The mechanism of the formation of higher alcohols from amino acids by *Saccharomyces cerevisiae*." Biochemical Journal **74**(3): 568-576.
- Sentheshanmuganathan, S. and S. R. Elsdon (1958). "The mechanism of the formation of tyrosol by *Saccharomyces cerevisiae*." Biochemical Journal **69**(2): 210-218.
- Severs, N. J., E. G. Jordan and D. H. Williamson (1976). "Nuclear pore absence from areas of close association between nucleus and vacuole in synchronous yeast cultures." J Ultrastruct Res **54**(3): 374-387.
- Schmidt, A., J. Kunz and M. N. Hall (1996). "TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast." Proceedings of the National Academy of Sciences **93**(24): 13780-13785.
- Smets, B., R. Ghillebert, P. De Snijder, M. Binda, E. Swinnen, C. De Virgilio and J. Winderickx (2010). "Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet **56**(1): 1-32.
- Smith, F. C., S. P. Davies, W. A. Wilson, D. Carling and D. G. Hardie (1999). "The SNF1 kinase complex from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates the transcriptional repressor protein Mig1p in vitro at four sites within or near regulatory domain 1." FEBS Letters **453**(1-2): 219-223.
- Thevelein, J. M., L. Cauwenberg, S. Colombo, J. H. De Winde, M. Donation, F. Dumortier, L. Kraakman, K. Lemaire, P. Ma, D. Nauwelaers, F. Rolland, A. Teunissen, P. Van Dijck, M. Versele, S. Wera and J. Winderickx (2000). "Nutrient-induced signal

- transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast." Enzyme and Microbial Technology **26**(9–10): 819-825.
- Tkach, J. M., A. Yimit, A. Y. Lee, M. Riffle, M. Costanzo, D. Jaschob, J. A. Hendry, J. Ou, J. Moffat, C. Boone, T. N. Davis, C. Nislow and G. W. Brown (2012). "Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress." Nat Cell Biol **14**(9): 966-976.
- Toda, T., S. Cameron, P. Sass, M. Zoller, J. D. Scott, B. McMullen, M. Hurwitz, E. G. Krebs and M. Wigler (1987). "Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **7**(4): 1371-1377.
- Urban, J., A. Soulard, A. Huber, S. Lippman, D. Mukhopadhyay, O. Deloche, V. Wanke, D. Anrather, G. Ammerer, H. Riezman, J. R. Broach, C. De Virgilio, M. N. Hall and R. Loewith (2007). "Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*." Molecular Cell **26**(5): 663-674.
- Vachova, L., H. Kucerova, F. Devaux, M. Ulehlova and Z. Palkova (2009). "Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies." Environ Microbiol **11**(2): 494-504.
- van Dyck, L., M. Dembowski, W. Neupert and T. Langer (1998). "Mcx1p, a ClpX homologue in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **438**(3): 250-254.
- Vuralhan, Z., M. A. H. Luttkik, S. L. Tai, V. M. Boer, M. A. Morais, D. Schipper, M. J. H. Almering, P. Kötter, J. R. Dickinson, J.-M. Daran and J. T. Pronk (2005). "Physiological Characterization of the ARO10-Dependent, Broad-Substrate-Specificity 2-Oxo Acid Decarboxylase Activity of *Saccharomyces cerevisiae*." Applied and Environmental Microbiology **71**(6): 3276-3284.
- Wickner, R. B. (1996). "Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Rev **60**(1): 250-265.
- Wiseman, S. A., J. N. N. J. Mathot, N. J. de Fouw and L. B. M. Tijburg (1996). "Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits." Atherosclerosis **120**(1): 15-23.
- Yang, X., R. Jiang and M. Carlson (1994). "A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex." Embo j **13**(24): 5878-5886.
- Zheng, X.-F., D. Fiorentino, J. Chen, G. R. Crabtree and S. L. Schreiber (1995). "TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin." Cell **82**(1): 121-130.